

**Induktion von CYP1A-Isoenzymen in humanen Hepatoblastom-Zellen,
Rattenhepatom-Zellen und primären Rattenhepatozyten und Beeinflussung
der Apoptose in primären Rattenhepatozyten durch „dioxinartige“ PCBs.**

Vom Fachbereich der Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte

Dissertation

(D 386)

vorgelegt von

Dipl. Chem. Michael Zeiger

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 8. Mai 2001

Kaiserslautern 2001

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 8. Mai 2001

Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. H. Sitzmann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Trommer

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen April 1998 und März 2001 im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk für die Aufnahme in seinem Arbeitskreis, für die Überlassung des interessanten Themas, für den mir gewährten Freiraum bei der Gestaltung und Durchführung dieser Arbeit sowie für seine wohlwollende Unterstützung und Förderung während meiner gesamten Promotionszeit.

Für Anna und Lisa

Durs Grünbein

Traum vom Fliegenden Fisch

Ein Fisch, der fliegt...so fing Columbus' Traum
An einem Morgen an, mit einem Willkürakt.
Ist da ein Indien, das westwärts liegt
Sticht man von Spanien aus in See?
Er sah, und traute seinen Augen kaum
Wie aus dem Wasser Fische stiegen. *Neptuns Vögel*,
Schrieb er ins Tagebuch. In Wüsten Schnee
Entdecken war gewöhnlicher als diese Tiere
Die aus den Wellen schnellten wie von Bögen
Die Pfeile jener Wilden, die er nackt
Am andern Ufer fand und *Indios* nannte.
Was las er auf den Helmen seiner Kanoniere
Stumm nach der Landung? Dieses Unbekannte
War ihm unheimlich wie ein Fisch, der fliegt.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	13
1.1	Polychlorierte Biphenyle.....	13
1.1.1	Ursprung, Verwendung und Eigenschaften von PCBs	13
1.1.2	Toxikologische Betrachtung der PCBs	14
1.1.3	Ah-Rezeptor-Modell.....	16
1.2	Apoptose	17
1.2.1	Charakteristika der Apoptose	18
1.2.2	Kanzerogenese	21
1.2.3	Die Relevanz der Apoptose in der Hepatokanzerogenese	22
1.3	Protein-Tyrosin-Kinase c-Src	23
1.3.1	Aufbau und Funktion von c-Src	23
1.3.2	Ah-Rezeptor vermittelte c-Src Aktivierung	26
2	AUFGABENSTELLUNG.....	27
3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Geräte und Materialien	28
3.2	Chemikalien	29
3.3	Lösungen, Nährmedien, Puffer.....	32
3.3.1	Perfusion	32
3.3.2	Zellkultur	33
3.3.3	RNA-Analyse	36
3.3.4	Bakterien und Plasmide	38
3.3.5	Protein-Tyrosin-Kinase Assay	38
3.3.6	Western-Blotting.....	39
3.3.7	Sonstige Lösungen.....	40
3.4	Versuchstiere.....	41
3.5	Präparation von Rattenhepatozyten	41
3.5.1	Leberperfusion.....	41
3.5.2	Bestimmung der Zellzahl	43
3.5.3	Bestimmung der Vitalität	43

3.6	Zellkultur	44
3.6.1	Kollagenbeschichtung der Kulturflächen	44
3.6.2	Kulturbedingungen	44
3.6.3	Zellbehandlung	45
3.6.4	Zellernte	47
3.6.5	Zellfixierung und Färbung	47
3.7	Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) – Aktivität	48
3.7.1	Fluorimetrische Bestimmung der EROD-Aktivität	48
3.7.2	Proteinbestimmung	49
3.7.3	Statistische Auswertung	49
3.8	Northern-Blot-Analyse	50
3.8.1	RNA-Isolierung nach der Chomczynski-Methode	50
3.8.2	Konzentrationsbestimmung der RNA	51
3.8.3	Elektrophoretische Auftrennung der RNA	51
3.8.4	Northern-Blot	52
3.8.5	Hybridisierung	53
3.8.6	Rehybridisierung	54
3.9	Gewinnung von cDNA-Sonden	55
3.9.1	Transformation der Plasmide in kompetente Bakterien	55
3.9.2	Vermehrung und Isolation der Plasmide	55
3.9.3	Restriktionsverdau und DNA-Gelelektrophorese der Plasmid-DNA	56
3.9.4	Isolierung der cDNA	57
3.10	Fluoreszenzmikroskopie	58
3.10.1	Statistik	59
3.11	Bestimmung der Cytotoxizität	59
3.12	Bestimmung der Protein-Tyrosin-Kinase Aktivität	59
3.12.1	Präparation der subzellulären cytosolischen Fraktion	59
3.12.2	c-Src selektiver Protein-Tyrosin-Kinase Assay	60
3.12.3	Qualitative Bestimmung des Phosphorylierungsgrades	61
3.12.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	62
3.12.5	Western-Blotting	62

4	ERGEBNISSE	64
4.1	Induktion der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase Aktivität.....	64
4.1.1	Hepatoblastom-Zelllinie HepG2	64
4.1.2	Northern-Blot-Analyse	66
4.1.3	Primäre Rattenhepatozyten.....	67
4.1.4	Rattenhepatom-Zelllinie H4IIE.....	69
4.2	Beeinflussung der Apoptose durch PCB 81, 126 und 169.....	71
4.2.1	Beeinflussung der basalen Apoptose durch die PCBs 81, 126 und 169.....	72
4.2.2	Beeinflussung der induzierten Apoptose durch die PCBs 81, 126 und 169	74
4.2.3	CYP1A-Inhibitor 8-Methoxypsoralen	77
4.2.4	Cytotoxizität der PCBs 81, 126 und 169 an primären Rattenhepatozyten.....	77
4.3	Bestimmung der Protein-Tyrosin-Kinase Aktivität.....	79
4.3.1	Beeinflussung der c-Src-Aktivität durch 2,3,7,8-TCDD	79
4.3.2	Qualitative Abschätzung der Kinase-Aktivität in primären Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von TCDD.....	84
5	DISKUSSION	86
5.1	PCB induzierte CYP1A-Isoenzym Aktivität.....	86
5.2	Beeinflussung der Apoptose in primären Rattenhepatozyten.....	91
5.2.1	Beeinflussung der basalen Apoptose	92
5.2.2	Beinflussung der induzierten Apoptose	93
5.2.3	Mechanistischer Ansatz.....	94
5.3	Bestimmung der Protein-Tyrosin-Kinase Aktivität (c-Src)	95
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	LITERATURVERZEICHNIS	98
8	ANHANG	107
8.1	IUPAC-Nomenklatur der PCBs	107
8.2	Schematische Darstellung der verwendeten PCBs	109

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Allgemeine Strukturformel der PCBs	13
Abb. 1.2:	Modell der Ah-Rezeptor vermittelnden Gen-Expression durch Induktion mit PCB	17
Abb. 1.3:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Fußes menschlicher Embryonen.....	18
Abb. 1.4:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von primären Rattenhepatozyten im Frühstadium der Apoptose	19
Abb. 1.5:	Endonuklease Aktivität führt zur Ausbildung von definierten DNA-Bruchstücken	20
Abb. 1.6:	Beispiele für Phänomene der späten Apoptose-Stadien: fragmentiertes Chromatin und Membran-Blebbing.....	21
Abb. 1.7:	schematische Struktur der Protein-Tyrosin-Kinase c-Src.....	24
Abb. 1.8:	partielle Kristallstruktur des menschlichen Src-Proteins in der „Backbone“-Darstellung	25
Abb. 3.1:	Skizze einer <i>in situ</i> Leberperfusion.....	42
Abb. 3.2:	Behandlungsschema zur Apoptose.....	46
Abb. 3.3:	Strukturformel von DAPI und Sulforhodamin.....	47
Abb. 3.4:	Oxidative Dealkylierung von Ethoxyresorufin zu Resorufin	48
Abb. 3.5:	elektrophoretische Auftrennung der RNA im Agarosegel	52
Abb. 3.6:	skizzierter Aufbau der Blotting-Apparatur	53
Abb. 3.7:	analytische Gelelektrophorese der isolierten cDNA.....	58
Abb. 4.1:	Induktion der EROD-Aktivität durch PCB 77, 81, 114, 126 und 2,3,7,8-TCDD in HepG2-Zellen	65
Abb. 4.2:	Northern-Blot-Analyse der PCBs 81, 114, 126 und 2,3,7,8-TCDD.....	67
Abb. 4.3:	Induktion der EROD-Aktivität durch PCB 81, 114, 123, 157, 167 und 189 in primären Rattenhepatozyten.....	68
Abb. 4.4:	Induktion der EROD-Aktivität durch PCB 81, 114, 123, 157 und 167 in H4IIE-Zellen	70
Abb. 4.5:	Beispiele für fragmentierte und kondensierte Zellkerne.....	71

Abb. 4.6:	Veränderung der basalen Apoptose durch PCB 81	72
Abb. 4.7:	Veränderung der basalen Apoptose durch PCB 126	73
Abb. 4.8:	Veränderung der basalen Apoptose durch PCB 169	73
Abb. 4.9:	Veränderung der induzierten Apoptose durch PCB 81	75
Abb. 4.10:	Veränderung der induzierten Apoptose durch PCB 126	75
Abb. 4.11:	Veränderung der induzierten Apoptose durch PCB 169	76
Abb. 4.12:	Beeinflussung der induzierten bzw. basalen Apoptose durch PCB 126 kombiniert mit einem CYP1A-Inhibitor	77
Abb. 4.13:	Cytotoxizität der PCBs 81, 126 und 169 in primären Rattenhepatozyten.....	78
Abb. 4.14:	Cytotoxizität der PCBs 81, 126 und 169 in primären Rattenhepatozyten (UV-bestrahlt).....	79
Abb. 4.15:	Detektion der Protein-Tyrosin-Kinase Aktivität mittels eines c-Src selektiven Substratpeptids in Abhängigkeit von 2,3,7,8-TCDD	80
Abb. 4.16:	Untersuchung der cytosolischen Fraktion mittels Western-Blot Technik auf c-Src.....	81
Abb. 4.17:	Qualitative Bewertung der Phosphorylierungs-Aktivität der cytosolischen Fraktion	81
Abb. 4.18:	Qualitative Abschätzung des potentiellen Meßbereichs des Szintillations-Zählers.....	82
Abb. 4.19:	Bestimmung der Phosphorylierung bei Verwendung von c-Src im PTK-Assay	84
Abb. 4.20:	Qualitative Abschätzung der Phosphorylierung in Abhängigkeit von TCDD	85
Abb. 5.1:	Induktion der EROD-Aktivität in primären Rattenhepatozyten.....	86
Abb. 5.2:	Induktion der EROD-Aktivität in H4IIE-Zellen.....	87
Abb. 5.3:	Induktion der EROD-Aktivität in HepG2-Zellen	87

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Charakteristische Merkmalsunterschiede zwischen Nekrose und Apoptose	19
Tab. 1.2:	Auswahl möglicher Substrate der Tyrosin-Kinase c-Src.....	26
Tab. 3.1:	Zusammensetzung der Grundmedien DMEM und Waymouth	34
Tab. 3.2:	Zusammensetzung der Medien H4IIE, NIH _A und NIH _B	35
Tab. 4.1:	EC ₅₀ -Werte (nM) und 95%-Konfidenzintervall der EROD-Aktivität in HepG2-Zellen	65
Tab. 4.2:	REP-Werte für HepG2-Zellen.....	66
Tab. 4.3:	EC ₅₀ -Werte (nM) und 95%-Konfidenzintervall der EROD-Aktivität in primären Rattenhepatozyten.....	68
Tab. 4.4:	REP-Werte für primäre Rattenhepatozyten	69
Tab. 4.5:	EC ₅₀ -Werte (nM) und 95%-Konfidenzintervall der EROD-Aktivität in H4IIE-Zellen.....	70
Tab. 4.6:	REP-Werte für H4IIE-Zellen	70
Tab. 4.7:	Veränderung der basalen Apoptose in Abhängigkeit der PCBs 81, 126 und 169	74
Tab. 4.8:	Beeinflussung der induzierten Apoptose in Abhängigkeit der PCBs 81, 126 und 169	76
Tab. 5.1:	Zusammenfassung der EC ₅₀ -Werte für die jeweiligen PCBs	89
Tab. 5.2:	Zusammenfassung der REP- und TEF-Werte für die verwendeten PCBs	90
Tab. 8.1:	IUPAC-Nomenklatur der PCBs	107

Abkürzungsverzeichnis

Ah	aryl hydrocarbon
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CAD	caspase-activated DNase
CAR	constitutively active receptor
cDNA	komplementäre DNA
cpm	counts per minute
CYP	Cytochrom P450
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
i.p.	intraperitoneal
KAB	kinase assay buffer
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KDB	kinase dilution buffer
M	molar ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
min	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	per-arnt-sim

PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCDD	Polychlorierte Dibenzodioxine
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
REP	relative potency factor
RNA	Ribonucleinsäure
ROM	reactive oxygenated metabolite
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Src Homolog
SSC	Saline Sodium Citrat
SSPE	Saline Sodium Phosphate EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TCDD	Tetrachlordibenzodioxin
TEF	TCDD equivalency factors
TEQ	TCDD equivalence
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
WHO	World Health Organization
XRE	xenobiotic responsive element

1 EINLEITUNG

1.1 Polychlorierte Biphenyle

Polychlorierte Biphenyle (PCBs) sind ubiquitär vorkommende Umweltkontaminanten. Die allgemeine Strukturformel dieser aus 209 Kongeneren zusammengesetzten Stoffklasse ist in Abb. 1.1 dargestellt.

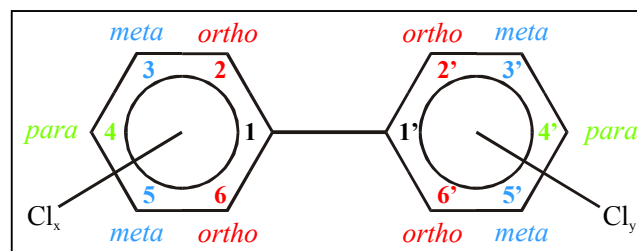


Abb. 1.1: Allgemeine Strukturformel der PCBs

Zur Vereinfachung der Nomenklatur wurde von Ballschmiter (1980) eine Numerierung der PCB-Kongeneren vorgeschlagen, die von der IUPAC als offizielle Nomenklatur übernommen wurde. Die Auflistung der kompletten Liste ist im Anhang Kap. 8.1 aufgeführt.

1.1.1 Ursprung, Verwendung und Eigenschaften von PCBs

Die großtechnische Synthese von polychlorierten Biphenylen erfolgte Anfang des 20. Jahrhunderts, als man sich der hervorragenden Eigenschaften dieser Substanzklasse bewußt wurde. Für den industriellen Nutzen der PCBs sprechen unter anderem die hohe chemische und thermische Stabilität, der hohe Flammpunkt, ihre hohe Viskosität über einen großen Temperaturbereich, eine hohe Dielektrizitätskonstante und geringer Dampfdruck.

Auf Grund der Unselektivität der chemischen Reaktion erhält man bei der Produktion ein vielfältiges Gemisch an polychlorierten Biphenylen. Die durchschnittliche Anzahl wird mit ca. 130 Kongeneren angegeben (Safe, 1990). Die gewählten Reaktionsbedingungen bestimmen den mittleren Chlorierungsgrad und somit die technischen Eigenschaften. Produktnamen wie Aroclor, Clophen und Kanechlor seien hier genannt (Environmental Protection Agency, 2001b).

Industriell wurden PCB-Gemische in elektrischen Transformatoren und Kondensatoren, als Weichmacher, Flammenschutzmittel, Schmiermittel, Klebstoffe und Dichtungsmasse verwendet. Zum Einsatz kamen sie sowohl in offenen, wie auch geschlossenen Systemen.

Außerdem entstehen PCBs bei der Verbrennung von organischen Materialien in Anwesenheit von Chlorverbindungen; beispielsweise in Krematorien oder Müllverbrennungsanlagen, wobei die Konzentration an polychlorierten Biphenylen durch die Verbrennungstemperatur und die Sauerstoffzufuhr reguliert und minimiert werden kann.

Seit den sechziger Jahren ist man sich der hohen Persistenz und Akkumulation der polychlorierten Biphenyle in der Umwelt bewußt. In der Bundesrepublik Deutschland ist daher seit 1978 die Anwendung von PCBs in offenen Systemen verboten, 1983 erfolgte die Einstellung der gesamten Produktion.

Nach Schätzungen wurden zwischen 1930 und 1983 weltweit zwischen 1-1,5 Millionen Tonnen PCBs produziert. Über Auswaschung und Verfrachtungen mit Aerosolen in Kombination mit der hohen Lipophilie und geringen mikrobiellen Abbaubarkeit dieser Substanzgruppe haben sich die PCBs zu einer ubiquitären Umweltkontaminante entwickelt (Eisenbrand, 1994; Falbe, 1995; Greim, 1996; Marquardt, 1994).

1.1.2 Toxikologische Betrachtung der PCBs

Die polychlorierten Biphenyle reichern sich auf Grund ihrer Persistenz und hohen Lipophilie im Fettgewebe von Lebewesen an. Die höchsten Konzentrationen findet man bei Säugern und fischfressenden Vögeln. Dabei spielt die Belastung von Milchprodukten und Fischen eine für den Menschen als Konsument relevante Rolle.

Ende der achtziger Jahre wurden in deutscher Milch PCB-Mengen von 90-140 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Milchfett bzw. in nordatlantischem Fischfilet eine durchschnittliche Menge von 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ an PCBs gemessen (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 1988). Diese Werte sind auf Grund der Verbote rückläufig.

Gestillte Säuglinge sind bereits durch die Belastung der Muttermilch erheblichen PCB-Mengen ausgesetzt. Durchschnittlich handelte es sich Anfang der neunziger Jahre hierbei um eine tägliche Menge von 41 μg pro Person, wobei das geringe Körpergewicht berücksichtigt werden muß. Im Vergleich mit ungestillten Kindern ergibt sich in den Anfangsjahren eine hohe Belastung durch polychlorierte Biphenyle, diese gleicht sich mit den Jahren aber an die Gehalte in ungestillten Kindern an. Die Konzentration von PCBs in Muttermilch ist auch hier in den letzten Jahren rückläufig (Patandin, 1998; Schrenk, 1994).

Die mittlere Halbwertszeit aller PCBs wird mit ungefähr sieben Jahren angegeben (Yakushiji, 1984). Die Metabolisierung erfolgt hauptsächlich in der Leber, die unterschiedliche Metabolisierbarkeit der einzelnen Kongeneren ist für das Auftreten von verschiedenen Kongenerenmustern im Fettgewebe verantwortlich (World Health Organization, 1993).

Die polychlorierten Biphenyle werden entsprechend ihrem Wirkungsmechanismus in zwei Gruppen eingeteilt. Eine klare Trennung zwischen den Gruppen ist jedoch nicht möglich. Es gibt zum einen die „dioxinartigen“ PCBs, deren Wirkungen analog dem 2,3,7,8-TCDD Ah-Rezeptor vermittelt sind (s. unten) und zum anderen die „Phenobarbital-Typ“ PCBs. Zur letzteren Gruppe sind bisher nur wenige mechanistische Erkenntnisse bekannt. Es zeigen sich Hinweise, daß deren Wirkungen u.a. über den „constitutively active receptor“ CAR vermittelt werden (Honkakoski, 2000).

Die „dioxinartigen“ PCBs zeigen in Tierexperimenten je nach Expositionsdauer und Spezies ein breites Spektrum an toxikologischen Effekten. Unter anderem sind hier zu nennen (Ahlborg, 1992):

- Wasting-Syndrom
- Leberschädigung
- Immunsuppression
- Beeinträchtigung der Schilddrüsenfunktion
- Hautirritationen
- Gehäuftes Auftreten von Ödemen
- Beeinträchtigung der Reproduktion
- Störung der Vitamin A-Homöostase

In weiteren Tierexperimenten konnte gezeigt werden, daß es sich bei den polychlorierten Biphenylen um nicht gentoxische Hepatokarzinogene handelt. Eine potentielle tumorpromovierende Wirkung beim Menschen konnte bisher nicht gezeigt werden, ist aber nicht auszuschließen (Greim, 1996).

Bisherige Erfahrungen der toxikologischen Wirkungen von PCBs auf den Menschen sind auf Folgeuntersuchungen nach Unfällen beschränkt. Bekannt geworden sind die als Yusho (Japan, 1968) und als Yu-Cheng (Taiwan, 1979) durch Verunreinigungen von Reisöl mit PCB aufgetretenen Vergiftungskatastrophen. Die Lebensmittel wurden durch Lecks im Wärmeaustauscher bei der Produktion des Reisöles in erheblichen Mengen mit PCBs und polychlorierten Dibenzofuranen (PCDFs) kontaminiert. Bei der betroffenen Bevölkerung kam es zu Chlorakne, chronischer Bronchitis und weiteren Symptomen. Durch die bei der Produktion von PCBs als Nebenprodukte entstehenden PCDFs können diese Effekte nicht eindeutig den polychlorierten Biphenylen zugeordnet werden (Greim, 1996).

Eine Möglichkeit zur toxikologischen Bewertung von „dioxinartigen“ PCB-Gemischen stellt das „TCDD equivalence“ TEQ-Konzept von Tanabe dar (Kannan, 1988). Hierbei werden die einzelnen Substanzen durch sogenannte „TCDD equivalency factors“ TEF-Werte charakterisiert. Das 2,3,7,8-TCDD erhält definitionsgemäß den Wert $TEF = 1$. Unter der Annahme der Additivität gilt für Gemische:

$$TEQ = \Sigma (\text{Konzentration} \cdot TEF)$$

Der TEF-Wert ist eine aus unterschiedlichen Untersuchungen resultierende und institutionell festgelegte Größe. Für die PCBs gelten die von der WHO festgelegten TEF-Werte (Van den Berg, 1998).

Die aus experimentellen Daten gewonnenen Werte werden im allgemeinen als „relative potencies“ REPs bezeichnet. Hierbei kommt dem 2,3,7,8-TCDD als Bezugsgröße ein $REP = 1$ zu. In ihrer Wirkung schwächere Substanzen erhalten einen $REP < 1$. Die Bestimmung dieser REPs erfolgt im Vergleich einer experimentell erfaßbaren Größe. Dies kann z.B. die Bestimmung der EC_{50} -Werte der CYP1A-Induktion sein.

1.1.3 Ah-Rezeptor-Modell

Untersuchungen haben gezeigt, daß die „dioxinartigen“ PCBs, die eine koplanoide Konformation einnehmen können (vornehmlich die non- und mono-*ortho* substituierten PCBs) mit dem „Arylhydrocarbon“ Ah-Rezeptor wechselwirken (Rowlands, 1997).

Der Ah-Rezeptor ist ein „basic helix-loop-helix“ bHLH ligandaktivierter Transkriptionsfaktor und gehört zur PAS (per-arnt-sim) Familie. Der Ah-Rezeptor liegt im Cytosol als Proteinkomplex vor. Zum einen binden zwei HSP90 Chaperone an den Rezeptor, die ihn vermutlich zur Ligandaufnahme befähigen und zusätzlich eine Dimerisierung verhindern (Rowlands, 1997). Außerdem werden weitere Proteine diskutiert, die mit dem Rezeptor im Cytosol wechselwirken; genaueres ist aber nicht bekannt. Bisherige Untersuchungen identifizierten ein 37-38 kDa großes Protein (Ma, 1996), ein 49 kDa Protein (Chen, 1994) und c-Src (Enan, 1996).

Bindet nun ein geeigneter Ligand (TCDD, PCB o.a.) an den Rezeptor, kommt es zur Expression der sogenannten „AhR gene battery“. Zu den bisher identifizierten Genen gehören die der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, Glutathion S-Transferase Ya, Aldehyd-3-Dehydrogenase und NAD(P)H: Chinonoxidoreduktase (Schrenk, 1998).

Der Mechanismus ist in Abb. 1.2 skizziert dargestellt. Der Ah-Rezeptor liegt im Cytosol als Proteinkomplex mit zwei HSP90-Proteinen und weiteren, hier nicht näher beschriebenen, Proteinen vor. Bindet nun ein geeigneter Ligand an den Ah-Rezeptor-Komplex, dissoziieren die HSP90-Proteine ab und der aktivierte Ligand-AhR-Komplex transloziert in den Zellkern, wo er mit dem „Ah-receptor nuclear translocator“ ARNT Protein dimerisiert. Dieser im Nucleus lokalisierte Proteinkomplex bindet nun spezifisch an die sogenannten „xenobiotic responsive elements“ XREs auf der DNA. Der so entstandene Enhancer-Komplex beeinflusst die Aktivität der Promotor-Region und steigert die Transkription der jeweiligen Gene (Rowlands, 1997; Whitlock, 1999).

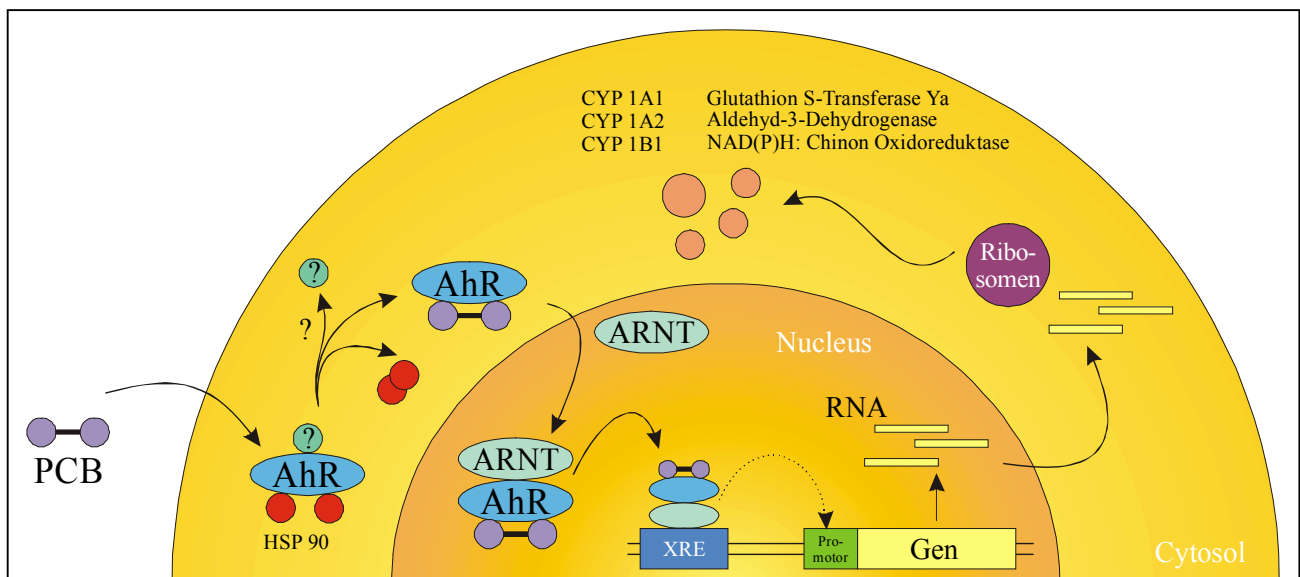


Abb. 1.2: Modell der Ah-Rezeptor vermittelnden Gen-Expression durch Induktion mit PCB

1.2 Apoptose

Der kontrollierte Zelltod ist ein im höchsten Maße notwendiger Mechanismus, der eine wichtige Rolle bei der Funktionalität eines mehrzelligen Organismus spielt. Es ist von entscheidender Bedeutung, daß ein Lebewesen über potentielle Regelmechanismen verfügt, die gezielt Zellen ausschalten können.

Zum einen ist es notwendig geschädigte oder präkanzerogene Zellen zu eliminieren, um weiteren Schaden abzuwenden – „better dead than wrong“ (Payne, 1995). Zum anderen kommt es während der normalen Entwicklung eines Lebewesens zur Notwendigkeit nicht mehr benötigte Zellen selektiv zu beseitigen (embryonale Entwicklung, Homöostase, Regulation des Immunsystems).

Bei der embryonalen Entwicklung führt dieser Mechanismus des kontrollierten Zelltodes zum Beispiel zur Ausbildung von Gliedmaßen. Abb. 1.3 zeigt das Frühstadium eines menschlichen

Fußes (links 52. Tag, rechts 57. Tag). Die Trennung der Zehen erfolgt durch die Entfernung von Zwischengewebe (Universität Bochum, 2001).



Abb. 1.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Fußes menschlicher Embryonen

1.2.1 Charakteristika der Apoptose

Anfang der siebziger Jahre prägten Kerr *et al.* für das Phänomen des programmierten Zelltodes den Begriff „Apoptose“ (Kerr, 1972). Sie beobachteten diskrete phänomenologische Charakteristika, die deutliche Unterschiede zum nekrotischen Zelltod (passiver, degenerativer Prozeß) darstellten (Wyllie, 1980).

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 1.1) gibt einen Überblick über diese charakteristischen Merkmale im Vergleich zur Nekrose.

Zellen, die durch endo- bzw. exogene Stimuli in die Apoptose übergehen, durchlaufen mehrere charakteristische Apoptose-Stadien, an deren Ende die Phagozytierung der „Apoptotic Bodies“ durch Nachbarzellen oder Makrophagen steht.

Im Einzelnen lassen sich diese Stadien wie folgt beschreiben (Schulte-Hermann, 1992):

Die Zelle beginnt zu schrumpfen, das Cytoplasma und das Chromatin beginnen zu kondensieren. Phänomenologisch häufig ist die Anordnung des Chromatins an die Zellkernperipherie. Im Mikroskop erkennt man die Ausbildung von „Halbmonden, Sicheln oder Tropfen“.

Tab. 1.1: Charakteristische Merkmalsunterschiede zwischen Nekrose und Apoptose (Grün, 1998)

		Nekrose	Apoptose
Charakteristika	Physiologisch	<ul style="list-style-type: none"> Tod von Zellgruppen Entzündungsreaktion 	<ul style="list-style-type: none"> Tod einzelner Zellen keine Entzündungsreaktion
	Morphologisch	<ul style="list-style-type: none"> Anschwellen der Zellen Verlust der Membranintegrität 	<ul style="list-style-type: none"> Zellschrumpfung (Kondensation von Cytoplasma und Chromatin, Bildung sog. „apoptotic bodies“) Kein Verlust der Membranintegrität
	Biochemisch	<ul style="list-style-type: none"> Passiver Vorgang Zufällig verteilter Verdau der DNA (Schmier im Agarosegel) Postlytische DNA-Fragmentierung (spätes Ereignis des Zelltodes) 	<ul style="list-style-type: none"> Aktiver Prozeß Durch Endonucleaseaktivität definierte Nukleosomenfragmente (ca. 185 bp, DNA-Ladder im Agarosegel) Prälytische DNA-Fragmentierung (frühes Ereignis des Zelltodes)

Abb. 1.4 zeigt zwei Aufnahmen dieses Phänomens, hierbei handelt es sich um primäre Rattenhepatozyten im Fluoreszenz-Mikroskop die mit DAPI/Sulforhodamin angefärbt wurden (Kap. 3.6.5). Im linken Bild ist die „Tropfen“-Form zu erkennen, im rechten Bild die „Sichel“-Form.

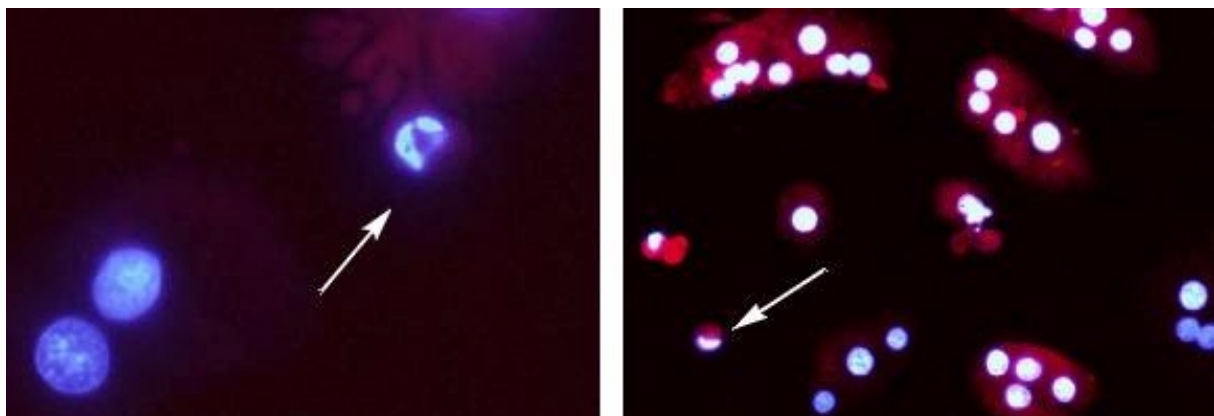


Abb. 1.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von primären Rattenhepatozyten im Frühstadium der Apoptose

Im weiteren kommt es zur Aktivierung von „Caspase-activated DNase“ CAD. Diese Endonuklease schneidet den DNA-Strang zwischen den Nukleosomen, es kommt zur Ausbildung von ca. 185 bp großen Bruchstücken (bzw. Vielfachen). Die Chromatinfragmente können gegenüber der Gesamt-DNA im Agarosegel als sogenannte „DNA-Ladder“ visualisiert werden (s. Abb. 1.5).

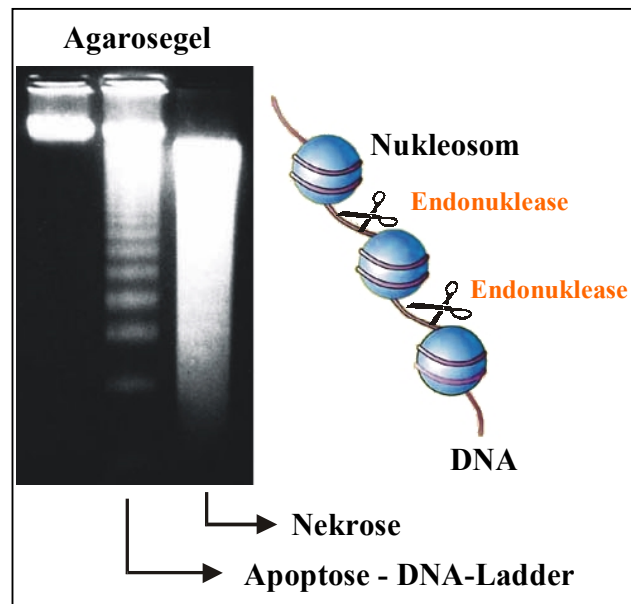


Abb. 1.5: Endonuklease Aktivität führt zur Ausbildung von definierten DNA-Bruchstücken

Abschließend kommt es zum sogenannten „Membran-Blebbing“ und zur Ausbildung der „Apoptotic Bodies“.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen zwei Variationen dieser Phänomene: in der linken Abbildung fragmentiertes Chromatin einer primären Rattenhepatozyten-Zelle (Fluoreszenz-Mikroskop mit DAPI/Sulforhodamin-Färbung). Rechts eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (Universität Bochum, 2001) einer humanen Pankreastumorzelle nach Induktion der Apoptose durch Stoffwechselgifte. Deutlich sind die zahlreichen Ausstülpungen der Plasmamembran zu erkennen (Membran-Blebbing).

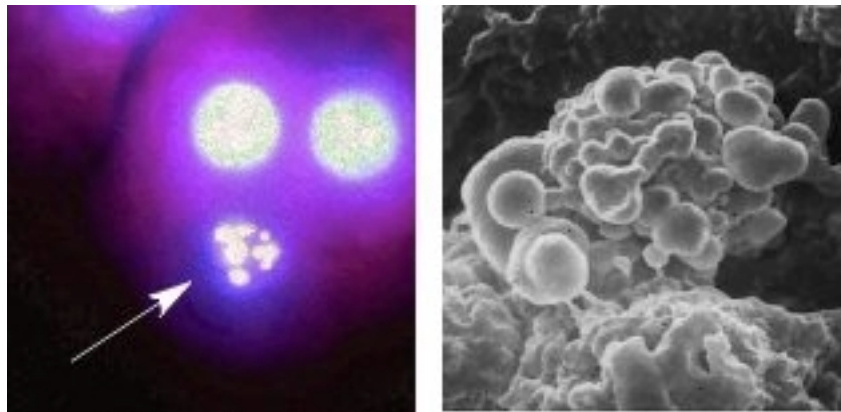


Abb. 1.6: Beispiele für Phänomene der späten Apoptose-Stadien: fragmentiertes Chromatin und Membran-Blebbing

Die Apoptose kann als funktioneller „Gegenspieler“ zur Mitose angesehen werden. In einem gesunden Lebewesen ist es wichtig, daß es ein Gleichgewicht zwischen neu gebildeten Zellen (Proliferation) und absterbenden Zellen gibt. Dieser Zustand wird als Homöostase beschrieben.

Kommt es nun zur Beeinflussung bzw. Störung der Apoptose und damit potentiell zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes, kann dies für ein Lebewesen diverse Folgen haben. Bekannte Krankheitsbilder die auf ein zuviel oder ein zuwenig an Apoptose beruhen, sind AIDS bzw. die Alzheimersche Krankheit.

1.2.2 Kanzerogenese

Neben der genauen Regulation der Apoptose ist es ebenso wichtig, die Zuwachsrates an neuen Zellen exakt zu regeln. Versagt dieses regulierende System, so kann es zu einem unkontrollierten Wachstum und zur Entstehung von Tumoren kommen. Dieser Vorgang wird als Kanzerogenese bezeichnet, es handelt sich hierbei um einen mehrstufigen Prozeß, bestehend aus: Initiation, Promotion und Progression.

Im ersten Schritt der Kanzerogenese, der Initiation, kommt es zu einer irreversiblen Veränderung der DNA. Neben spontanen, zufälligen Mutationen können auch physikalische Einflüsse (radioaktive bzw. UV-Strahlung), Viren (Hepatitis) oder genotoxische bzw. mutagene Substanzen solche Veränderungen des Genmaterials verursachen.

Kann der Gendefekt durch Reparaturmechanismen nicht beseitigt werden, wird dieser an die Tochterzellen weitergegeben. Im Laufe der Kanzerogenese kommt es zur Akkumulation solcher Gendefekte.

Initiierte Zellen, die durch die Mutationen einen selektiven Wachstumsvorteil erlangt haben, können unter dem Einfluß sogenannter Tumorpromotoren klonal expandieren und als Tumorstadien präneoplastische Herde im gesunden Gewebe bilden.

In der Progressionsphase kommt es durch die Häufung der Gendefekte zur Zunahme der Wachstumsanomalien und zur Ausbildung von malignen Tumoren, die invasives Wachstumsverhalten zeigen und metastasieren können (Eisenbrand, 1994; Forth, 1998; Harvey, 1996).

Durch die leichte Charakterisierung präneoplastischer Herde mittels histologischen, immunocytochemischen und biochemischen Methoden ist die Rattenleber ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Kanzerogenese. Es gibt zahlreiche Substanzen, die als Initiator, Promotor oder als komplettes Kanzerogen (initiiierend und promovierend) in der Rattenleber wirken.

Epigenetische Kanzerogene führen bei chronischer Gabe zur Tumorentstehung ohne eine Veränderung der DNA zu bewirken. Viele dieser epigenetischen Kanzerogene weisen eine tumorpromovierende Wirkung auf.

Polychlorierte Biphenyle sind den epigenetischen Hepatokanzerogenen zuzuordnen. In Tierexperimenten konnte ihre tumorpromovierende Wirkung gezeigt werden (Ahlborg, 1992).

1.2.3 Die Relevanz der Apoptose in der Hepatokanzerogenese

Kommt es zu einem genotoxischen Defekt, wird in der Regel durch sogenannte Tumorsuppressorgene die Fortschreitung des Zellzyklus angehalten. Können Reparaturenzyme die Defekte nicht beheben, so kommt es zur Apoptose, um weiteren Schaden für den Gesamtorganismus auszuschließen.

Die Fähigkeit zur Apoptose stellt in diesem Frühstadium der Kanzerogenese ein entscheidendes Kriterium für das weitere Schicksal der Zelle dar. Kommt es zur Hemmung der initiierten Apoptose durch exogene Substanzen, so unterbleibt dieser Schutzmechanismus. Man vermutet, daß die Hemmung der Apoptose eine Schlüsselrolle bei der Tumorpromotion spielt (Bursch, 1984; Tomei, 1988; Wright, 1994).

In der Rattenleber konnte nachgewiesen werden, daß präneoplastische Zellfoci sowohl eine erhöhte Proliferationsrate als auch eine erhöhte Apoptoserate aufweisen. Dieser Ausgleich im Zuwachs bzw. in der Zell-Abnahme führt im Frühstadium der Kanzerogenese lediglich zu einem geringen Gesamtwachstum der Foci. Wird die Apoptose durch endo- oder exogene Faktoren gehemmt, kann es zur klonalen Expansion und zur Tumorausbildung kommen (Bursch, 1984).

Ähnliche Effekte werden bei Phenobarbital beobachtet. Die tumorpromovierende Wirkung wurde zunächst auf einen proliferierenden Wachstumsstimulus zurückgeführt. Im weiteren Verlauf von Untersuchungen ergab sich, daß die Proliferationsrate einige Zeit nach Beginn der Phenobarbitalgabe wieder auf das Ausgangsniveau zurückging. Schulte-Hermann *et al.* zeigten, daß der tumorpromovierende Effekt von Phenobarbital auf eine Apoptose-Hemmung zurückzuführen ist (Schulte-Hermann, 1982; Schulte-Hermann, 1990).

Eine Hemmung der initiierten Apoptose in Rattenhepatozyten durch 2,3,7,8-TCDD konnte in *in vivo* und *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden (Stinchcombe, 1995 bzw. Wörner, 1996). In *in vitro* Versuchen mit primären Rattenhepatozyten konnte eine Hemmung der Apoptose durch „Phenobarbitaltyp“ PCBs gezeigt werden (Bohnenberger, 1999).

1.3 Protein-Tyrosin-Kinase c-Src

Die Modifizierung von Proteinen durch Phosphorylierung der Threonin, Serin oder Tyrosin-Reste zur Regulation der Aktivität ist ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion innerhalb der Zelle. Die Übertragung der Phosphatgruppen übernehmen sogenannte Protein – Kinasen. Man unterscheidet im Allgemeinen zwei Gruppen: die Ser/Thr- und die Tyr-Kinasen.

Zur letzteren Gruppe gehört unter anderem das Src-Protein (c-Src, 60 kDa), die Benennung resultiert aus der Entdeckung im Rous-Sarcoma-Virus (tierischer Retrovirus). Mutationen im *src* Proto-Onkogen führten zur einer permanent-aktiven Form, der die Fähigkeit zur Regulation der Kinase-Aktivität fehlt (Levinson, 1978). Src gehört zu einer struktural homologen Gruppe mit 8 weiteren Mitgliedern: *src*, *yes*, *yrk*, *fgr*, *fyn*, *blk*, *lck*, *hck* und *lyn*.

1.3.1 Aufbau und Funktion von c-Src

Die Struktur des c-Src Proteins ist in Abb. 1.7 schematisch dargestellt. Die N-terminale Src-Homologe SH4-Domäne dient zur Verankerung über Myristinsäure in der Plasma- und intrazellulären Membran (Courtneidge, 1980).

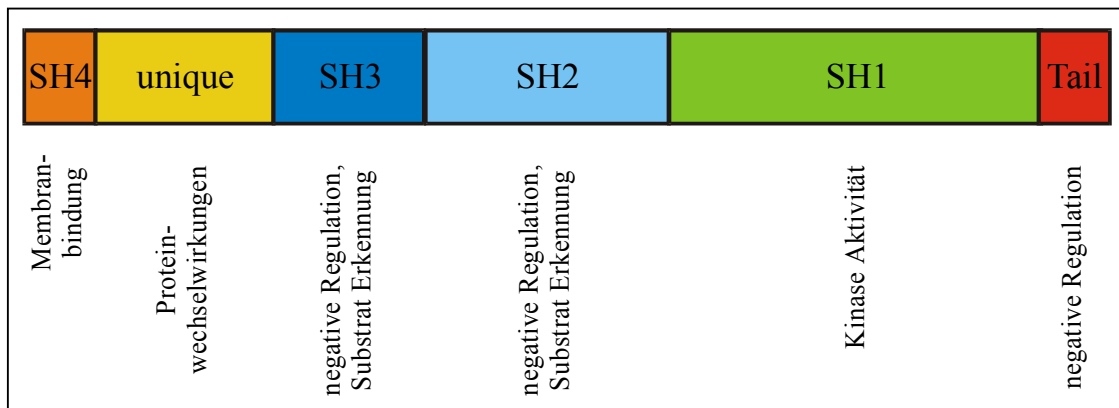


Abb. 1.7: schematische Struktur der Protein-Tyrosin-Kinase c-Src (Brown, 1996)

Die innerhalb der Proteinfamilie inhomologe „unique“-Domain dient vermutlich zur spezifischen Wechselwirkung der Mitglieder mit anderen Proteinen. So finden sich Hinweise, daß Src durch Cdc2/Cyclin Komplexe während der M-Phase innerhalb der „unique“-Region mehrfach phosphoryliert wird (Chackalaparampil, 1988; Morgan, 1989) und auch aktivierte Protein-Kinase C in diesem Bereich phosphoryliert (Cooper, 1990).

Die in der Src Familie konservierte SH1-Domäne stellt die eigentliche Kinase-Domäne dar. Experimente mit einer „Peptid-Bibliothek“ zeigten, daß folgende Sequenz bevorzugt am Tyrosin-Rest phosphoryliert wird: Glu-Glu-Glu-Ile-Tyr^{Gly/Glu}-Glu-Phe-Asp (Brown, 1996). Die SH1-Domäne weist zudem eine Autophosphorylierungs-Stelle auf (Smart, 1981). Die genaue Funktion dieses Tyrosin-Restes ist nicht geklärt, man vermutet einen stabilisierenden Effekt auf die katalytische-Domäne und somit einen Beitrag zur Kinase-Aktivität.

Die SH2-Domäne und die Tail-Region regulieren die Kinase-Aktivität des Src-Proteins. Die ca. 15 Aminosäuren lange C-terminale Domäne besitzt einen Tyrosin-Rest, der bei Phosphorylierung mit einer Region innerhalb der SH2-Domäne wechselwirken kann. Diese Wechselwirkung führt zu einer Strukturveränderung, die die Kinase-Aktivität fast vollständig hemmt (Brown, 1996). In der nachfolgenden Abbildung ist ein Teil der Kristallstruktur des menschlichen Src-Proteins in der inaktiven Form aufgezeigt (Xu, 1997; graphische Darstellung: RasMol). Der durch Phosphorylierung modifizierte Tyrosin-Rest ist hervorgehoben.

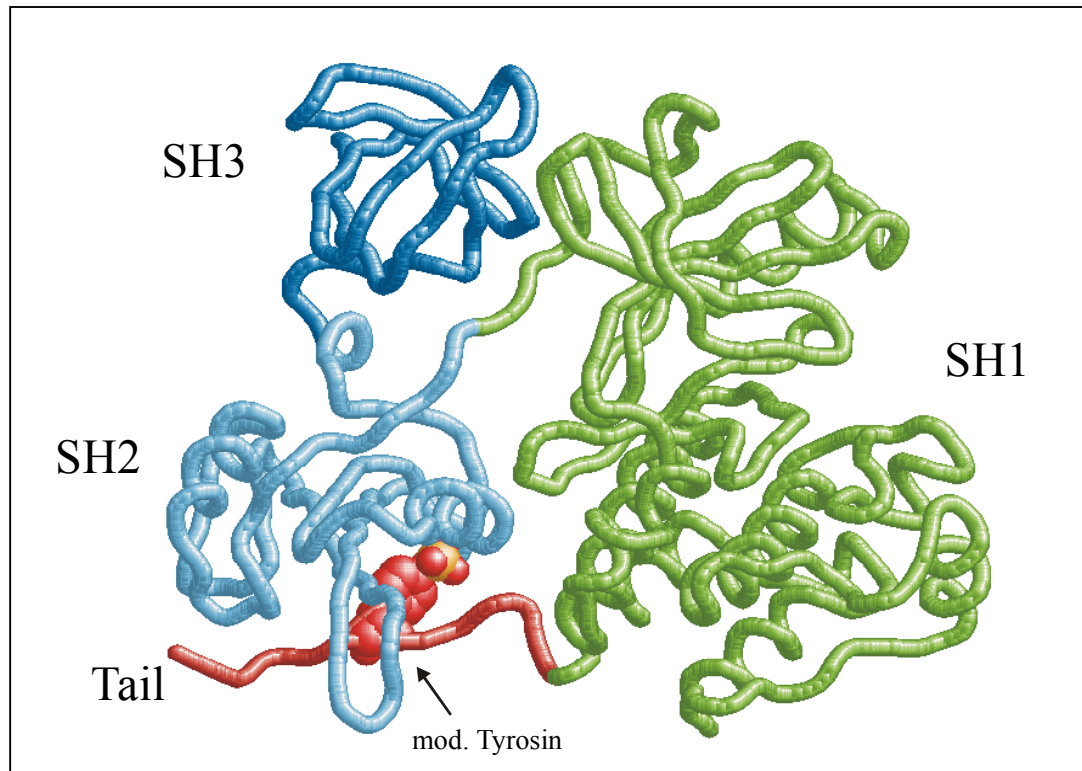


Abb. 1.8: partielle Kristallstruktur des menschlichen Src-Proteins in der „Backbone“-Darstellung (Xu, 1997)

Die SH3-Domäne bindet bevorzugt prolinreiche Liganden. Man findet Hinweise, daß Proteinwechselwirkungen über die SH3-Region an die SH2- und Kinase-Domäne weitergeleitet werden und somit indirekt Einfluß auf die Kinase-Aktivität nehmen könnten. Die SH3- und SH2-Domäne scheinen neben der Kinase-Domäne zusätzlich eine Rolle bei der Substraterkennung zu spielen (Brown, 1996).

Es gibt verschiedene Überlegungen, wie das Src-Protein aktiviert werden kann. Prinzipiell gibt es Hinweise darauf, daß Src zur Weiterleitung von Signalen membrangebunden vorliegen muß (Spencer, 1995).

Zum einen kann eine Phosphatase die Tyrosinphosphorylierung in der Tail-Region aufheben und so das Protein in seine aktive Form überführen. Weiterhin kann ein Protein über eigene modifizierte Tyrosinreste die Tail-Domäne verdrängen, selbst mit der SH2-Domäne wechselwirken und somit die Strukturveränderungen in der SH1-Region aufheben. Eine dritte Möglichkeit ist bereits beschrieben worden: prolinreiche Liganden können über die Bindung an die SH3-Domäne Auswirkungen auf die SH2- und SH1-Domäne ausüben und somit die Konformation des Proteins verändern (Brown, 1996).

Es gibt eine Vielzahl von Substraten mit unterschiedlichen Funktionen, die von c-Src phosphoryliert werden. Die nachfolgende Tabelle soll nur einen kurzen Überblick darüber geben.

Tab. 1.2: Auswahl möglicher Substrate der Tyrosin-Kinase c-Src

Src-Substrat	Funktion
RasGap	GTPase Aktivator für Ras
p85 PI3 Kinase	Untereinheit der PI3-Kinase
Shc	bindet Grb
Connexin 43	Gap Junction Protein
Calpactin I / Annexin II	Ca ²⁺ / Phospholipid Bindungsprotein

1.3.2 Ah-Rezeptor vermittelte c-Src Aktivierung

Mitte der achtziger Jahre konnte in *in vivo* Experimenten gezeigt werden, daß 2,3,7,8-TCDD einen deutlichen Anstieg der Kinase-Aktivität in Ratten-Hepatozyten hervorruft (Matsumura, 1984).

Die Beobachtung, daß die Phosphorylierungs-Aktivität innerhalb weniger Minuten nach Zugabe von TCDD in *in vitro* Experimenten erfolgte und dieser Effekt auch durch Hemmung der *de novo* Protein-Synthese mit Cycloheximid nicht unterdrückt wurde, legte die Vermutung nahe, daß neben der bereits in Kapitel 1.1.3 beschriebenen Ah-Rezeptor vermittelten Expression von Genen ein weiterer TCDD-induzierter Reaktionsweg möglich ist.

Weitere Versuche mit hepatozellulären Cytosolfractionen konnten dies bestätigen. Man identifizierte c-Src als den eigentlichen Startpunkt der Ah-Rezeptor gekoppelten Kinase-Aktivitäten (Enan, 1995). Enan und Matsumura selektierten daraufhin mit Hilfe von Ah-Rezeptor bzw. c-Src Antikörpern immunpräzipitatorisch einen Proteinkomplex, den sie als Ah-Rezeptor / c-Src Protein Assoziat verifizierten (Enan, 1996).

2 AUFGABENSTELLUNG

Zur Beurteilung der Wirkung von „dioxinartigen“ PCBs gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen an tierischen Primärzellen bzw. Zelllinien. Zur Risikoabschätzung für den Menschen ist eine Extrapolation der Daten nötig. Die dabei auftretenden Speziesunterschiede sind ein nicht zu vernachlässigendes Problem. Untersuchungen zur Bestimmung der „relative potencies“ (REP-Werte) an Primärzellen und Zelllinien menschlichen Ursprungs sind dagegen kaum beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Induktion der Ah-Rezeptor vermittelten CYP1A-Aktivität in der Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 durch ausgewählte PCBs bestimmt werden. Die allgemein akzeptierte CYP1A-Isoenzym vermittelte Messung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Aktivität wird hierfür herangezogen.

Es wurden die von der WHO als „dioxinartig“ eingestuften PCBs 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 157, 158, 167, 169 und 189 ausgewählt (Van den Berg, 1998). Darüberhinaus sollten bereits im Arbeitskreis vorhandene Daten bezüglich primären Rattenhepatozyten und der Rattenhepatom-Zelllinie H4IIE komplementiert werden (Schmitz, 1995). Hierbei handelt es sich um die PCBs 81, 114, 123, 157, 167 und 189.

Weiterhin sollten im weiteren Verlauf der Arbeit für die „dioxinartigen“ PCBs 81, 126 und 169 in primären Rattenhepatozyten die Beeinflussung der basalen sowie der durch UV-Licht induzierten Apoptose bestimmt werden. Hierbei wurde analog einem bereits im Arbeitskreis etabliertes *in vitro*-Modell zur Bestimmung der Apoptosehemmung vorgegangen (Wörner, 1996).

Eine auf die Apoptoserate einflußnehmende Cytotoxizität der PCBs 81, 126 und 169 sollte mit Hilfe des Farbstoffes Alamar Blue der Firma Serotec abgeschätzt werden. Weiterhin sollte durch Inhibierung von CYP1A mit 8-Methoxypsoralen bei den Untersuchungen mit PCB 126 ein möglicher Ansatz zur mechanistischen Wirkung geschaffen werden.

Abschließend sollte der von Blankenship und Matsumura beschriebene Protein-Tyrosin-Kinase Assay zur Messung der 2,3,7,8-TCDD induzierten c-Src Aktivität etabliert und zur Wirkungscharakterisierung der „dioxinartigen“ PCBs herangezogen werden (Blankenship, 1997).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte und Materialien

Autoklav

Webeco Typ C

Webeco GmbH, Schwertau

Brutschrank

Heraeus B 5060

Heraeus, Hanau

Elektrophoresekammern

Horizon 11-14(RNA)

Gibco BRL, Eggenstein

Mini-Protean II (Proteine)

BioRad, München

Easy-Cost (Agarosegel)

AGS, Heidelberg

Filmmaterial

X-Omat OR

Kodak, Stuttgart

Filterpapier

Whatman 3 MM

Whatman, Kent, UK

Fluoreszenz-Spektrometer

Lumineszenz-Spektrometer LS5

Perkin Elmer, Überlingen

Fotokassetten

X-Omatic mit Verstärkerfolien

Kodak, Stuttgart

Hybridisierungsöfen

Hybridiser HB-1D

Techne, Cambridge, UK

Kulturschalen

Petrischalen (94 x 16 mm)

Greiner, Nürtingen

Petrischalen (60 x 15 mm)

Greiner, Nürtingen

Multischalen (4 Wells)

Neolab, Heidelberg

Mikroskope

Fluoreszenzmikroskop (Axioskop)

Zeiss, Jena

Invertoskop DM IRB

Leica, Wetzlar

Perfusionsvorrichtung

Vasofix Braunülen (1,7 x 50 mm)

B. Braun, Melsungen

Einmal-Injektions-Spritzen (steril)

B. Barun, Melsungen

Einmal-Injektions-Kanülen

(steril, pyrogenfrei)

B. Braun, Melsungen

Leukosilk-Gewebebänder

Beiersdorf, Hamburg

Zentrifugenröhrchen

(Falcon, 50 ml, steril)

Greiner, Nürtingen

Präparierbesteck	
Seidentuch	
Phosphocellulose-Papier	
Whatmann PC-Sheets	Whatman, Kent, UK
Photometer	
UVIKON Spektrometer 930	Kontron, München
Radiodetektor	
Handmonitor LB 112	Berthold, München
Spannungsgeräte	
Power Supply ST305	Gibco BRL, Eggenstein
Power Pac 300	BioRad, München
Sterilbank	
UVF 6·125	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Sterilfilter	
Minisart Spritzenfilter (0,45 µm)	Sartorius, Götting
Rotilabo Spritzenfilter (0,45 µm)	Roth, Karlsruhe
Vacu Top Filter, Micron (0,45 µm)	Roth, Karlsruhe
Szintillationszähler	
LS 1701	Beckmann, München
Transfermembran	
Hybond P	Amersham, Braunschweig
Magnagraph Nylon (0,22 µm)	MSI
Ultraschallgerät	
Labsonic 2000	Bachofer, Reutlingen
UV-Strahlungsquellen	
Crosslinker FLX 20 M	Biometra, Göttingen
Zählkammer	
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	
Zentrifugen	
Microfuge R Zentrifuge	Beckmann, München
J2-21-Zentrifuge	Beckmann, München
Laborzentrifuge 1K15	Sigma, Steinheim

3.2 Chemikalien

[α - ³² P]-dCTP	ICN, Eschwege
[γ - ³² P]-ATP	ICN, Eschwege
Acrylamid / Bisacrylamid (30 : 0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose LMP	Gibco BRL, Eggenstein
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein

Alamar Blue	Serotec Limited
Ammoniumperoxidsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicilin	Sigma, Steinheim
Aprotinin	Sigma, Steinheim
ATP	Sigma, Steinheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto-Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit
Borsäure	Merck, Darmstadt
BSA Fraktion V	Roth, Karlsruhe
BSA, Fraktion V	Sigma, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase Typ IV	Sigma, Steinheim
DEPC	Sigma, Steinheim
Dexamethason	Sigma, Steinheim
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM Trockenmedium	Biochrom Seromed, Berlin
DMEM	Biochrom, Berlin
DNA aus Heringsperma	Sigma, Deisenhofen
DNA-Ladder (1kb)	Gibco BRL, Eggenstein
DNA-Molekulargewichtsstandard	Gibco BRL, Heidelberg
ECL-Plus Detection Kit	Amersham, Braunschweig
EDTA	Sigma, Steinheim
EGTA	Sigma, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ficoll 400	Sigma, Steinheim
FKS	Gibco BRL, Eggenstein
Folin-Ciocalteu-Reaganz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Formamid	Roth, Karlsruhe
Gentamycinsulfat	Biochrom Seromed, Berlin
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Herinssperma DNA	Sigma, Steinheim

ITS / ITS ⁺	Becton Dickinson, Heidelberg
Kaisers Glycerin-Gelatine	Merck, Darmstadt
Kaleidoscope Prestained Protein Standard	BioRad, München
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Steinheim
MOPS	Roth, Karlsruhe
NADP ⁺	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natrium-Kalium-Tartrat	Sigma, Steinheim
Nonidet P-40	Sigma, Steinheim
PCB IUPAC No. 81	L. Robertson, University of Kentucky Lexington, USA *
PCBs IUPAC No. 77, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189	Promochem, Wesel
Penicillin / Streptomycin	Biochrom Seromed, Berlin
Pentobarbital	Sigma, Steinheim
Pepstatin A	Sigma, Steinheim
Phenol (für RNA/DNA-Extraktion)	Roth, Karlsruhe
Phenol, TE-äquilibriert	Roth, Karlsruhe
Plasmidisolierungs-Kit	Qiagen, Hilden
PMSF	Sigma, Steinheim
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Heidelberg
Random primed labeling Kit	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonuclease	Boehringer, Mannheim
RNA-Molekulargewichtsmarker	Gibco BRL, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
Szintillationscocktail	Roth, Karlsruhe
2,3,7,8-TCDD	Promochem, Wesel
TEMED	Serva, Heidelberg
TRIS	Roth, Karlsruhe
Tween-20	ICN, Eschwege
Waymouth's Trockenmedium MD 705/1	Gibco BRL, Heidelberg
Yeast-Extract	Difco, Detroit (USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim

* Die Reinheit wurde per High Resolution Massen-Spektrometrie überprüft (TÜV Ecoplan GmbH, Donzdorf). Es wurden Verunreinigungen von ca. 4 % PCB 39 und 0,7 % nicht weiter charakterisierte Trichlor-Biphenyle gefunden.

3.3 Lösungen, Nährmedien, Puffer

3.3.1 Perfusion

Perfusionspuffer

NaCl	6,30 g
KCl	0,32 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,27 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
NaHCO ₃	1,81 g
HEPES	3,58 g
D-Glucose · H ₂ O	1,50 g

Ad 1 l H₂O bidest. (pH 7,4)

Präperfusionslösung I (PPI)

EGTA	0,038 g
------	---------

ad 1 l Perfusionspuffer (pH 7,4), sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

Präperfusionslösung II (PPII)

CaCl ₂ · H ₂ O	0,58 g
--------------------------------------	--------

ad 1 l Perfusionspuffer (pH 7,4), sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

Waschpuffer

CaCl ₂ · H ₂ O	0,58 g
BSA	20,00 g

ad 1 l Perfusionspuffer (pH 7,4), sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

Nembutal-Lösung

Pentobarbital	33 mg·ml ⁻¹ H ₂ O bidest.
---------------	---

Trypanblaulösung

Trypanblau	0,40 %
NaCl	0,81 %
KH ₂ PO ₄	0,06 %

3.3.2 Zellkultur

Die Minimalmedien H4IIE, NIH_A und NIH_B enthalten als Grundmedium Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) bzw. Waymouth MD 705/1-Medium in unterschiedlichen Mengen. Die Zusammensetzung der Grundmedien ist in Tab. 3.1 angegeben.

DMEM-Flüssigmedium

Trockenmedium (5 l-Portion) unter ständigem Rühren in 4,5 l H₂O bidest. lösen
Zugabe von 18,5 g NaHCO₃
pH-Wert auf 7,4 einstellen und auf 5 l auffüllen
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

Waymouth MD 705/1 (5 l)

Trockenmedium (5 l-Portion) unter ständigem Rühren in 4,5 l H₂O bidest. lösen
Zugabe von 11,2 g NaHCO₃
pH-Wert auf 7,4 einstellen und auf 5 l auffüllen
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C

HEPES

100 ml-Portion 1M HEPES mit H₂O bidest. herstellen
pH-Wert auf 7,4 einstellen
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C

Dexamethason

Herstellen einer 2,5 mM Dexamethason-Lösung in Ethanol
Lagerung bei -20 °C

Gentamycinsulfat

Herstellen einer Gentamycinsulfat-Lösung in H₂O bidest. (c=50 mg·ml⁻¹)
sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C in 500 µl Portionen.

Tab. 3.1: Zusammensetzung der Grundmedien DMEM und Waymouth

Substanz	DMEM [mg·l ⁻¹]	Waymouth MD 705/1 [mg·l ⁻¹]
Anorganische Salze		
NaCl	6400	6000
KCl	400	150
CaCl ₂	200	-
KH ₂ PO ₄	-	80
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	-	120
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	-	0,5
Fe(NO ₃) ₃ · 9 H ₂ O	0,1	-
MgSO ₄ · H ₂ O	-	0,08
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	-	240
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200	100
NaHCO ₃	3700	2240
NaH ₂ PO ₄	124	-
Na ₂ HPO ₄	-	300
Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	-	566
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	-	0,11
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	-	0,25
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	-	0,12
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	-	0,15
Aminosäuren		
L-Arginin · HCl	84	75
L-Asparaginsäure	-	60
L-Cystein · HCl	-	90
L-Cystein	48	15
L-Glutamin	580	350
L-Glutaminsäure	-	150
Glycin	30	50
L-Histidin	-	128
L-Histidin · HCl · H ₂ O	42	-
L-Isoleucin	105	25
L-Leucin	105	50
L-Lysin · HCl	146	240
L-Methionin	30	50
L-Phenylalanin	66	50
L-Prolin	-	50
L-Serin	42	-
L-Threonin	95	75
L-Tryptophan	16	40
L-Tyrosin	72	40
L-Valin	94	65
Vitamine		
Ascorbinsäure	-	17,5
Biotin	-	0,02
Cholinchlorid	4	250
Folsäure	4	250
i-Inositol	7,2	1
Nicotinamid	4	1
D-Calcium-Pantothenat	4	1
Pyridoxal · HCl	4	1
Riboflavin	0,4	1
Thiamin · HCl	4	10
Vitamin B12	-	0,2
Weitere Komponenten		
D-Glucose	1000	5000
Glutathion (reduziert)	-	15
Hypoxanthin	-	25
Natriumpyruvat	110	-
Phenolrot	15	10

H4IIE- bzw. NIH-Medien

Es wurden die Medien H4IIE bzw. NIH_{A/B} verwendet. Bei den Versuchen mit NIH_{A/B} - Medium wurde zum Anwachsen der Hepatozyten beim Ausplattieren das FKS-haltige Medium NIH_A verwendet. Adhäsionsmoleküle gewährleisteten ein Andocken der Zellen an die Kollagenschicht. Das serumfreie Medium NIH_B dagegen gewährleistet stabile, definierte Zellkulturbedingungen. In der nachfolgenden Tabelle sind die Zusammensetzungen der einzelnen Medien aufgeführt.

Tab. 3.2: Zusammensetzung der Medien H4IIE, NIH_A und NIH_B

Komponenten	H4IIE	NIH _A	NIH _B
Waymouth MD 705/1	-	250 ml	250 ml
FKS	100 ml	50 ml	-
HEPES	-	5 ml	5 ml
Pen/Strep	5 ml	-	-
Gentamycinsulfat	-	500 µl	500 µl
Dexamethson	500 µl	250 µl	250 µl
ITS	-	500 µl	-
ITS ⁺	-	-	5 ml
DMEM	ad 500 ml	ad 500 ml	ad 500 ml

Die NIH_{A/B} -Zusätze ITS bzw. ITS⁺ haben folgende Zusammensetzungen.

Tab. 3.3: Zusammensetzung von ITS und ITS⁺

Komponenten	ITS	ITS ⁺
Insulin	5 µg·ml ⁻¹	6,25 µg·ml ⁻¹
Transferrin	5 µg·ml ⁻¹	6,25 µg·ml ⁻¹
selenige Säure	5 ng·ml ⁻¹	6,25 µg·ml ⁻¹
BSA	-	1,25 mg·ml ⁻¹
Linolsäure	-	5,35 µg·ml ⁻¹

Anschließend erfolgte eine Medienkontrolle auf sterilen Petrischalen für 48 h im Brutschrank. Danach wurden die Kontrollen mikroskopisch auf Kontaminationen hin untersucht.

3.3.3 RNA-Analyse

50x Denhardt

Ficoll 400	10 g·l ⁻¹
Polyvinylpyrrolidon	10 g·l ⁻¹
BSA	10 g·l ⁻¹

sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C

20x SSC-Puffer

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M

pH-Wert auf 7,4 einstellen und autoklavieren

20x SSPE-Puffer

NaCl	175,3 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	27,6 g
EDTA	7,4 g

ad 1 l H₂O bidest. (pH 7,4), autoklavieren

10x MOPS-Puffer

MOPS	0,2 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM

pH-Wert auf 7,4 einstellen und autoklavieren

5x TBE-Puffer

Tris	54,0 g
Borsäure	27,5 g
EDTA-Lösung (0,5 M, pH = 8,0)	20 ml

ad 1 l H₂O bidest, autoklavieren

Deionisiertes Formamid

50 g Mischbett-Ionenaustauscher (BioRad AG 501-X8) in 500 ml Formamid geben und eine Stunde bei RT rühren. Abfiltrieren und in 50 ml Portionen bei -20 °C lagern.

Denaturierungspuffer

Formamid (deionisiert)	345 µl
Formaldehyd (37 %)	120 µl
10x MOPS-Puffer	35 µl
DEPC-H ₂ O	11,5 µl
Ethidiumbromid (5 mg·ml ⁻¹)	5,5 µl

vor Gebrauch frisch ansetzen

DEPC-Wasser

Diethylpyrocarbonat	0,1 % (v/v)
---------------------	-------------

In H₂O bidest., 1 Stunde rühren und weitere 24 Stunden stehen lassen, autoklavieren

GT-Lösung

Guanidiniumthiocyanat	4 M
Tris	0,5 M
EDTA	4 mM
	in DEPC-H ₂ O

vor der Verwendung wurde frisch zugesetzt:

2-Mercaptoethanol	1 %
-------------------	-----

Heringssperma-DNA

1 g DNA in 100 ml sterilem H₂O unter Erwärmen lösen. Den Ansatz 20 mal durch eine Spritze mit Kanüle ziehen und abschließend in 500 µl Aliquots bei -20 °C lagern.

Prähybridisierungslösung

Formamid	7,5 ml
50x Denhardt	1,5 ml
SDS (10%)	750 µl
H ₂ O (steril)	1,3 ml
20x SSPE	3,8 ml
Heringssperma-DNA	50 µl

TE-Puffer

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

pH-Wert auf 8,0 einstellen und autoklavieren

Waschlösung

1x SSPE	
SDS	0,1 %

3.3.4 Bakterien und PlasmideAmpicillin-Lösung

100 mg Ampicillin in 1 ml H₂O bidest. lösen, sterilfiltrieren und in 500 µl Portionen bei -20 °C lagern.

LB-Medium

NaCl	10 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g

In 1 l H₂O bidest. lösen, pH-Wert auf 7,0 einstellen und autoklavieren. Für Selektionszwecke wurde nach dem Abkühlen 1 ml Ampicillin zugeben.

LB_{Amp}-Agar-Platten

NaCl	10 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Agar	20 g

In 1 l H₂O bidest. lösen, pH-Wert auf 7,0 einstellen und autoklavieren. Nachdem Abkühlen auf ca. 50 °C einen Milliliter Ampicillin zugeben und in sterile Petrischalen (94x16 mm) gießen. Lagerung bei 4 °C.

3.3.5 Protein-Tyrosin-Kinase AssayAprotinin-Lösung

Herstellen einer Aprotinin-Lösung in H₂O bidest. ($c = 200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Lagerung bei -20°C in 200 µl Portionen.

EGTA-Lösung

Herstellen einer EGTA-Lösung in 1N NaOH ($c = 100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), Lagerung bei -20 °C in 200 µl Portionen.

Leupeptin-Lösung

Herstellen einer Leupeptin-Lösung in H₂O bidest. ($c = 50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Lagerung bei -20 °C in 200 µl Portionen.

Pepstatin A-Lösung

Herstellen einer Pepstatin-Lösung in Ethanol ($c = 70 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Lagerung bei -20°C in 200 μl Portionen.

PMSF-Lösung

Herstellen einer PMSF-Lösung in Ethanol ($c = 10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), Lagerung bei -20°C in 200 μl Portionen.

 Na_3VO_4 -Lösung (aktiviert)

Herstellen einer 200 mM Na_3VO_4 -Lösung in H_2O bidest. und einstellen des pH-Wertes mit HCl oder NaOH auf $\text{pH} = 10$. Diese gelbe Lösung so lange kochen, bis eine farblose Lösung entsteht (ca. 5-10 min). Die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen und den pH-Wert wieder auf $\text{pH} = 10$ einstellen, aufkochen und anschließend der pH-Wert erneut einstellen. Dieses Verfahren solange wiederholen, bis sich der pH-Wert nicht weiter verändert.

Kinase-Dilution-Buffer (KDB)

HEPES	50 mM
EDTA	0,1 mM

pH-Wert auf 7,5 einstellen und autoklavieren, vor der Verwendung wurden noch 0,015% Brij 35 hinzugefügt.

Kinase-Assay-Buffer (KAB)

Kinase-Dilution-Buffer	100 ml
Na_3VO_4 (aktiviert, 200 mM)	100 μl
MnCl_2	20 mM
BSA	$0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
β -Mercaptoethanol	0,2 %
Proteasehemmer (EGTA, PMSF, Apro, Leu, Pep A)	je 2 μl

kurz vor der Verwendung ansetzen

3.3.6 Western-BlottingAnodenpuffer I

Tris	0,3 M
Methanol	10%

pH-Wert auf 10,4 einstellen

Anodenpuffer II

Tris	25 mM
Methanol	10%
pH-Wert auf 10,4 einstellen	

Kathodenpuffer

Tris	25 mM
Glycin	40 mM
Methanol	20 %
SDS	0,05%
pH-Wert auf 9,4 einstellen	

TBS-Lösung

NaCl	140 mM
Tris-HCl	10 mM
pH-Wert auf 7,4 einstellen	

TBS-Tween

Tween-20	0,05%
In TBS-Lösung	

Blockier-Lösung

Magermilch-Pulver	10%
In TBS-Lösung	

Inkubations-Lösung

Magermilch-Pulver	5%
In TBS-Lösung	

3.3.7 Sonstige LösungenTris-Sucrose-Puffer

Sucrose	0,32 M
Tris	30 mM
pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen und autoklavieren	

Elektroden-Puffer für SDS-PAGE

Glycin	8,8 g
Tris	6 g
SDS (10%)	10 ml
Ad 1 l H ₂ O bidest, pH = 8,3	

Lämmli-Puffer

Tris-Lösung (1,2 M, pH = 6,8)	100 µl
Glycerin	100 µl
SDS-Lösung (10%)	200 µl
2-Mercaptoethanol	20 µl
Bromphenolblau-Lsg (0,05%)	40 µl
Vor Gebrauch frisch ansetzen	

3.4 Versuchstiere

Die Rattenleberperfusion wurde an männlichen Wistar-Ratten (Charles River, Hamburg) mit einem Körpergewicht von 150-200 g durchgeführt. Gehalten wurden die Tiere im Tierhaus der Universität Kaiserslautern in Makrolon-Käfigen unter künstlichen Tag-Nacht-Lichtverhältnissen. Sie hatten zu Trinkwasser und Trockenfutter (Altromin, Lage) freien Zugang.

3.5 Präparation von Rattenhepatozyten

3.5.1 Leberperfusion

Als Grundlage zur Durchführung der Perfusion diente eine zweistufige *in situ* Perfusionstechnik, die 1976 von Seglen modifiziert wurde. Alle verwendeten Lösungen wurden sterilfiltriert und vor Beginn der Präparation im Wasserbad auf 42°C temperiert. Alle sonstigen Hilfsmittel waren autoklaviert.

Die Ratte wurde durch eine *i.p.* Injektion einer Nembutal-Lösung (300 µl pro 100 g Körpergewicht) anästhesiert. Zur Kontrolle der Narkosewirkung wurde der sogenannte Bauchmuskelreflextest herangezogen, bei dem die Kontraktion der Bauchmuskulatur durch Zusammendrücken der Schwanzwurzel eine nicht vollständig eingetretene Narkose anzeigt.

Die Bauchhöhle wurde bis zum Sternum geöffnet und die Leber mit ihren Gefäßsystemen freigelegt. Es erfolgte eine Injektion des Antikoagulans Heparin (1000 U·ml⁻¹, 0,1 ml pro

100 g Körpergewicht, Einwirkzeit ca. 2 min) in die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*), um eine vorzeitige Blutgerinnung zu verhindern. Um die Pfortader (*Vena portae*) wurde eine zunächst lose Ligatur gelegt, die nach dem Einstich der Kanüle, durch welche die Perfusionslösungen in die Leber gelangten, festgezogen wurde. Anschließend wurde die untere Hohlvene durchtrennt, um das Abfließen des Perfusats aus der Leber in die Bauchhöhle zu ermöglichen (s. Abb. 3.1).

Die Leber wurde bis zur völligen Entblutung (nach etwa 10 min bei einer Durchflußgeschwindigkeit von $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) zunächst mit der EGTA-haltigen Präperfusionslösung durchgespült, die durch Entzug von Ca^{2+} -Ionen das Lösen von Desmosomen bewirkt.

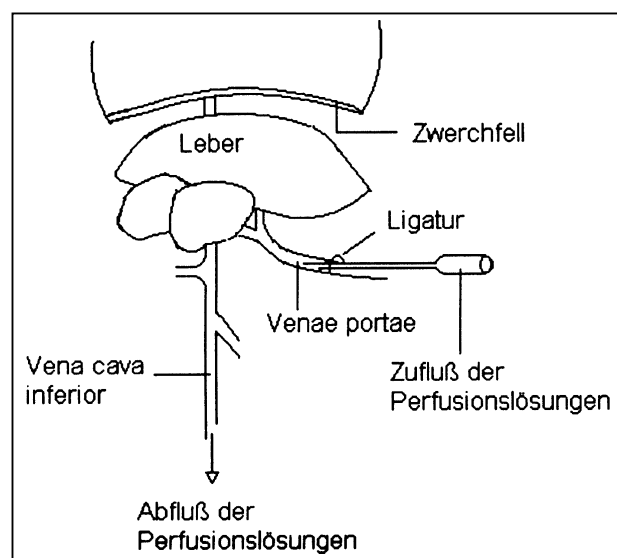


Abb. 3.1: Skizze einer *in situ* Leberperfusion

Die anschließend der entbluteten Leber zugeführte Perfusionslösung enthielt frisch gelöste Collagenase (100 mg auf 200 ml PPII) und Ca^{2+} -Ionen. Die durch Ca^{2+} -Ionen aktivierte Collagenase bewirkt über das Auflösen der extrazellulären Matrix eine Dissoziation des Leberparenchyms in Einzelzellen. Sobald die Leber eine netzartige Oberflächenstruktur aufwies (nach ca. 10 min bei einer Durchflußrate von 20 ml pro Minute), wurde der Perfusionsvorgang abgebrochen und die nun weiche Leber vorsichtig herauspräpariert.

Unter sterilen Bedingungen wurde die Leberkapsel über einem Seidentuch vorsichtig mit einer Pinzette geöffnet, die Hepatozyten unter Zugabe von insgesamt 200 ml Waschpuffer ausgeschwemmt und durch das Seidentuch filtriert. Die so entstandene Zellsuspension wurde auf 4 x 50 ml sterile Falcon-Röhrchen verteilt und zur Abtrennung von toten Zellen bei 50 g und RT 2-3 min zentrifugiert. Nachdem die Zellpellets durch langsames Schwenken in je 25 ml Waschpuffer resuspendiert waren, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei den gleichen Bedingungen. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen in je 8 ml

Waschpuffer aufgenommen und diese Teilsuspensionen in einem sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt, wodurch man 35-40 ml Zellsuspension erhielt.

3.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer wurden die Gesamtzellzahl sowie die Vitalität bestimmt. Diese Kammer weist eine Tiefe von 0,2 mm auf, die kleinsten Quadrate haben eine Fläche von 0,0625 mm². Daraus berechnet sich nun ein Volumen von 0,0125 µl pro kleinstem Quadrat, das einem Achtzigstel eines Mikroliters entspricht und aus dem somit der „Kammerfaktor“ 80 resultiert. Unter dem Mikroskop wurden 3 Felder mit jeweils 16 Kleinstquadraten ausgezählt.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach Verdünnung von 10 µl Zellsuspension mit 990 µl Waschpuffer. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{GZ \cdot 80 \cdot 1000 \cdot V_f}{16}$$

GZ	=	durchschnittlich ausgezählte Gesamtzahl
80	=	Kammerfaktor
16	=	ausgezählte Kleinstquadrate
1000	=	Umrechnung von µl auf ml
V _f	=	Verdünnungsfaktor 100

3.5.3 Bestimmung der Vitalität

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte nach dem Trypanblau-Ausschlußtest. Dabei wurde ein Aliquot einer 1:100 Verdünnung mit derselben Menge Trypanblau-Lösung versetzt. Da tote Zellen durch Eindringen des Farbstoffs blau angefärbt wurden, konnte man sie unter dem Mikroskop von lebenden Zellen unterscheiden.

Das Verhältnis von ungefärbten und damit lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl gibt Auskunft über die Zellvitalität der Präparation. Durch Multiplikation des Vitalitätsfaktors mit der unter Kap. 3.5.2 bestimmten Zellzahl pro Milliliter ergibt sich die Lebendzellzahl, die zur Einstellung der Zelldichte der Primärkultur verwendet wurde.

$$\text{Vitalitätsfaktor (\%)} = \frac{\text{Zahl der lebenden Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \cdot 100$$

Die Zahl der lebenden Zellen lag in der Regel zwischen 10 und 25 Millionen pro Milliliter. Für die Versuchsauswertung wurden ausschließlich Präparationen mit mindestens 85% Vitalität herangezogen.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Kollagenbeschichtung der Kulturflächen

Die Kultivierung der humanen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2, der Rattenhepatom-Zelllinie H4IIE und der primären Ratten-Hepatozyten erfolgte auf kollagenbeschichteten Kulturflächen.

Zur Herstellung der Kollagenlösung wurden die aus abgehäuteten Rattenschwänzen präparierten Kollagenfasern zunächst unter einer Rotlicht-Lampe getrocknet und anschließend über Nacht unter UV-Licht sterilisiert (in dieser Form sind die Fasern bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagerfähig). Es wurden jeweils 1 g Kollagenfasern in 900 ml 0,05 %iger Essigsäure 24 Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und anschließend ungelöste Bestandteile mittels Zentrifugation (3500 g) abgetrennt.

Die Petrischalen wurden ohne Deckel auf der Sterilbank verteilt. In eine Platte wurde etwas Kollagenlösung gegeben und diese dann sukzessive auf die nächste Platte abgegossen. Der verbleibende Kollagenfilm bildet die Beschichtung. Für mikroskopische Untersuchungen wurden zuvor die Kulturschalen unter UV-Licht sterilisiert, anschließend die abgeflamten Objektträger eingelegt und mittels einer Pipette die Kollagenlösung aufgetragen, verteilt und erneut unter UV-Licht sterilisiert.

3.6.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden generell im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert.

primäre Rattenhepatozyten

Für die Untersuchung der EROD-Induktion wurden je 1,5 Mio. Zellen in H4IIE-Medium auf kollagenierten 60 mm Kulturschalen ausgesät. Nach einer dreistündigen Anhaftungsphase wurde das Medium erneuert, anschließend erfolgte die Zellbehandlung (s. Kap. 3.6.3). Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen abgeerntet.

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden je 1,2 Mio. Zellen in 5 ml H4IIE-Medium auf einen Objektträger ausgesät ($60.000\text{ Zellen pro cm}^2$). Nach 3 Stunden wurde das Medium erneuert (3 ml) und 12 Stunden später erfolgte die Zellbehandlung (s. Kap. 3.6.3).

Für die Untersuchungen der Gesamt-Kinase Aktivität wurden je 1,5 Mio. Zellen in NIH_A -Medium auf kollagenierten 60 mm Kulturschalen ausgesät. Nach 3 Stunden wurde das Medium gegen NIH_B -Medium ersetzt und anschließend erfolgte die Zellbehandlung (s. Kap. 3.6.3). Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen abgeerntet.

Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 und Rattenhepatom-Zelllinie H4IIE

Bei den H4IIE-Zellen handelt es sich um eine Rattenhepatom-Zelllinie, die vom Reuber-H35-Hepatom (Reuber, 1961) abstammt und von Pitot als kontinuierliche Linie etabliert wurde (Pitot, 1964). Die menschliche Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 stammt von einem 15-jährigen männlichen Argentinier (Knowles, 1983). Die hier verwendeten Linien wurden freundlicherweise von Dr. F. Wiebel zur Verfügung gestellt. Zur Untersuchung der EROD-Induktion wurden nur Zellen der Passagen 15-35 verwendet.

Von einer komplett bewachsenen 94 mm Kulturplatte (100% Konfluenz) wurde das Medium abgesaugt, 3 ml Trypsin/EDTA zupipettiert und 5 min (H4IIE) bzw. 15 min (HepG2) bei 37 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt, die Zellsuspension in weitere 20 ml Medium überführt und diese auf 10 Kulturplatten (60 mm) zu je 3 ml verteilt. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50% im Brutschrank belassen (wenn nötig erfolgte alle 48 h ein Mediumwechsel). Anschließend wurde das Medium erneuert und es erfolgte die Zellbehandlung (s. Kap. 3.6.3). Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen abgeerntet. Unter diesen Bedingungen war nach 48 Stunden eine fast vollständige Konfluenz erreicht, außerdem gewährleistet dieses Vorgehen nach Erfahrungen vorangegangener Arbeiten (Lipp, 1991) hohe Werte der spezifischen Aktivität und damit eine gute Auswertbarkeit.

3.6.3 Zellbehandlung

Die Zugabe der in DMSO gelösten PCBs bzw. TCDD erfolgte in Anlehnung an Sawyer (1982) so, daß bei jedem Konzentrationspunkt eine konstante DMSO-Konzentration von 0,5 % im Medium vorhanden war. Aus den Stammlösungen wurde also für jeden Konzentrationspunkt eine Applikationslösung hergestellt, die im Vergleich zur gewünschten Endkonzentration 200fach konzentriert war. Zu den 3 ml Kulturmedium wurden also 15 µl zupipettiert.

EROD-Induktion und Northern-Blot-Analyse

Die Behandlung der Zellen erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema, nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Zellen abgeerntet (s. Kap. 3.6.4).

mikroskopische Untersuchungen zur Apoptose

Die Behandlung der primären Rattenhepatozyten erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Grün (1998).

Zwölf Stunden nach dem ersten Medienwechsel, wurde das Medium abgesaugt und bei einem Teil der Proben mittels UV-Bestrahlung ($90 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$) die Apoptose induziert. Anschließend wurden 3 ml Medium hinzugefügt und die Zellen für 30 min kultiviert. Die Behandlung der Zellen erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema. Pro Kulturschale wurde ein Objektträger mit DMSO als Kontrolle behandelt und zwei Objektträger mit der jeweiligen PCB-Konzentration. Nach weiteren 6 Stunden wurden die Zellen, wie in Kap. 3.6.5 beschrieben, fixiert und gefärbt.

Folgende Abbildung soll das Behandlungsschema noch einmal verdeutlichen.

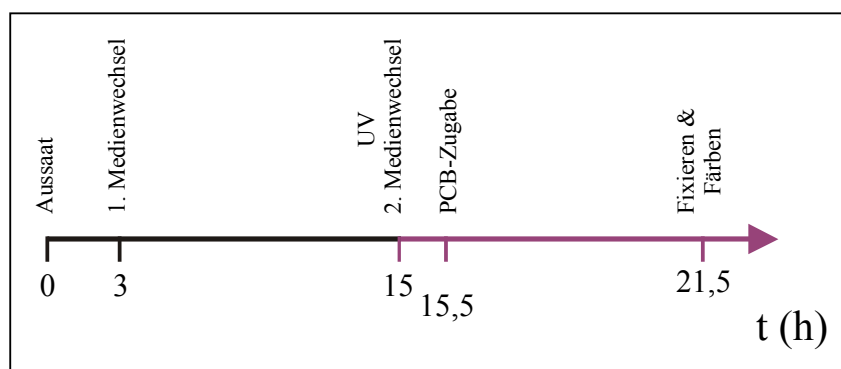


Abb. 3.2: Behandlungsschema zur Apoptose

Für die Behandlung in Kombination mit dem CYP1A-Inhibitor 8-Methoxypsoralen (8-MOP), wurde das Behandlungsschema geringfügig verändert. Von der Substanz wurde eine Stammlösung mit der Konzentration $c = 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ lichtgeschützt angesetzt. Anschließend wurden jeweils 50 ml Medium vorgelegt und nach folgendem Schema behandelt.

Inkubations-Medium:

- 25 μl DMSO + 250 μl 8-MOP-Lösung ($c = 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$)
- 275 μl DMSO
- 25 μl PCB 126 ($c = 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) + 250 μl 8-MOP ($c = 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$)
- 25 μl PCB 126 ($c = 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) + 250 μl DMSO

Hiermit wurde eine Endkonzentration von $c = 3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ an PCB 126 und $c = 100 \mu\text{M}$ an 8-MOP und eine vergleichbare Endkonzentration von 0,6 % DMSO im Medium erreicht. Analog dem Behandlungsschema (Abb. 3.2) wurde 30 Minuten nach dem zweiten Medienwechsel das Medium abgesaugt und erneut durch jeweils 3 ml des obigen Inkubations-Mediums ersetzt.

3.6.4 Zellernte

Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült. Die Zellen wurden mit 1 ml eiskaltem Tris-Sucrose-Puffer abgeschabt, in Eppi-Cups überführt und sofort auf Eis gestellt. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (500 g, 4 °C, 5 min) und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde bei -20 °C gelagert.

3.6.5 Zellfixierung und Färbung

Das Medium wurde nach der Behandlung abgesaugt und die Objektträger mit 0,9 %iger NaCl-Lösung kurz gespült. Anschließend wurden die Präparate eine halbe Stunde in einer 1 %igen Glutaraldehydlösung bei 4 °C fixiert und erneut kurz in 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült. Danach wurden die Zellen in DAPI/Sulforhodamin 101-Lösung gefärbt (10 min), mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült und anschließend luftgetrocknet. Abschließend wurden die Präparate in Kaisers-Glyceringelatine eingedeckelt. Die Aufbewahrung der fertigen Präparate erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Diese Methode der Färbung erlaubt eine gleichzeitige fluoreszenzmikroskopische Detektion von Zellkernchromatin (blau, A/T-spezifische Bindung des Farbstoffes DAPI) und Cytoplasma (rot, Sulforhodamin 101 bindet an Proteine im Cytosol).

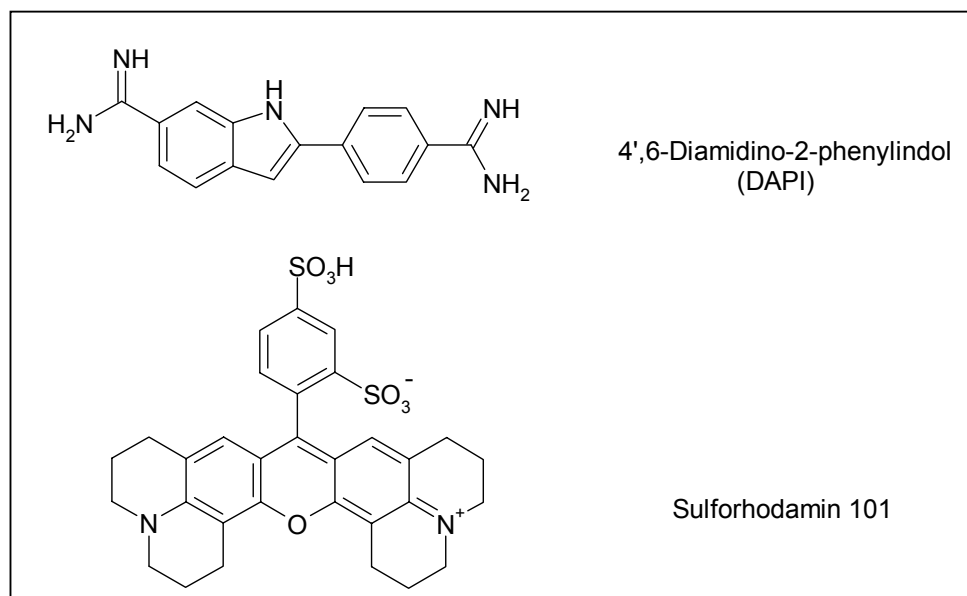


Abb. 3.3: Strukturformel von DAPI und Sulforhodamin

3.7 Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) – Aktivität

3.7.1 Fluorimetrische Bestimmung der EROD-Aktivität

Die Bestimmung der EROD-Aktivität als Gradmesser der CYP1A-Induktion wurde von Burke und Mayer entwickelt (Burke, 1974) und hier nach der Variante von Pohl und Fouts unter Zusatz von EDTA durchgeführt (Pohl, 1980).

Es handelt sich dabei um eine Cytochrom P450 1A-katalysierte oxidative Dealkylierung (s. Abb. 3.4). Die kontinuierliche Regeneration des NADPH erfolgt hier nach der IDH-Methode, wobei die Isocitratdehydrogenase-Reaktion die Reduktionsäquivalente liefert.

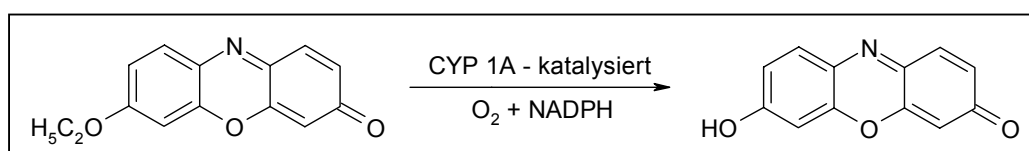


Abb. 3.4: Oxidative Dealkylierung von Ethoxyresorufin zu Resorufin

Der Ansatz war folgendermaßen zusammengesetzt (auf Eis):

- 50 μl Tris-HCl (1 M, pH = 7,4)
- 50 μl MgCl_2 (50 mM)
- 50 μl EDTA (0,6 mM)
- 50 μl Natrium-Isocitrat (50 mM)
- 50 μl NADP^+ (5 mM)
- 50 μl IDH-Lösung ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
- 210 μl H_2O bidest.
- 70 μl Zellhomogenat

Um Fehler innerhalb eines Versuchsansatzes zu minimieren, wurde ein entsprechendes Vielfaches des obigen Ansatzes vorgelegt (ohne Zellhomogenat). Anschließend wurden jeweils 460 μl des Mix auf Eppi-Cups verteilt und 70 μl Zellhomogenat hinzugefügt.

Die Ansätze wurden im Wasserbad bei 37 °C für zwei Minuten vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 μl Ethoxyresorufin (75 μM in DMSO) gestartet. Nach 10 Minuten wurde durch Zugabe von 1 ml Methanol gestoppt und das entstehende Proteinpräzipitat abzentrifugiert (5000 g, 5 min).

Am Fluorimeter wurden folgende Parameter eingestellt:

- Exzitation 550 nm
- Emission 585 nm

Spalt	5,0 beiderseits
Fix Scale	10,00
Response	3

Dem Leerwert (70 µl H₂O bidest. anstatt Homogenat) wurde über die AutoZero-Funktion der Meßwert Null zugeteilt. Die im Ansatz gebildete Menge Resorufin wurde anhand einer Eichkurve ermittelt und zur Errechnung der spezifischen Aktivität in Beziehung zur Reaktionszeit und zur eingesetzten Proteinmenge (s. Kap. 3.7.2) gesetzt.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität (pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{Em \cdot F_{EROD}}{t \cdot c_{Prot} \cdot V_{Prot}}$$

Em	=	Emission
F _{EROD}	=	spez. Faktor (ermittelt aus der Eichgerade)
T	=	Reaktionszeit
c _{Prot}	=	Proteinkonzentration (mittels Lowry)
V _{Prot}	=	Volumen des Proteinhomogenats

3.7.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry durchgeführt (Lowry, 1951) und folgendermaßen angesetzt.

95 µl H₂O bidest.
 5 µl Zellhomogenat
 100 µl NaOH (1M)
 1 ml Lowry A

Inkubation 10 Minuten bei RT

100 µl Lowry B und sofort kräftig schütteln

Inkubation 30 Minuten bei RT

Die photometrische Messung erfolgte bei 720 nm. Dem Leerwert (H₂O bidest. anstelle von Proteinhomogenat) wurde über die AutoZero-Funktion des Photometers der Meßwert Null zugeteilt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichkurve ermittelt.

3.7.3 Statistische Auswertung

Die spezifischen Enzymaktivitäten wurden für jedes Kongener in drei Versuchsreihen mit jeweiliger Doppelbestimmung gemessen.

Die so erhaltenen Meßwerte wurden zu einem Wert gemittelt. Die arithmetischen Mittelwerte der Enzymaktivität und der Logarithmus der Konzentrationen wurden mittels der Software Origin ermittelt. Aus den so gewonnenen sigmoidalen Kurven wurden die EC_{50} -Werte berechnet.

Das Programm gibt als statistische Bewertung ein 95%-Konfidenzintervall aus, innerhalb dessen ein durch die gegebene Konzentration bewirkter Aktivitätswert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angetroffen wird. Für die EC_{50} -Werte wurde nur der Konzentrationswert der angepaßten Idealkurve berücksichtigt und daraus der REP-Wert berechnet.

Die oberen und unteren Grenzen des Konfidenzintervalls sind jedoch in den Tabellen des Ergebnisteils mit aufgeführt.

3.8 Northern-Blot-Analyse

3.8.1 RNA-Isolierung nach der Chomczynski-Methode

Die RNA wurde nach der von Chomczynski und Sacchi veröffentlichten Methode isoliert (Chomczynski, 1987). Sämtliche Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Folgender Ansatz wurde je Probe in einem Rundboden-Röhrchen vorgelegt:

1 ml Phenol (zur DNA/RNA-Isolierung)
100 µl Natrium-Acetat-Lösung (2M, pH = 4)
200 µl Chloroform-Isoamyl-Mischung (49:1)

Die in Abschnitt 3.6.4 gewonnen Pellets wurden in je 1 ml Guanidiumthiocyanat-Mercaptoethanol-Lösung resuspendiert und ca. 3 Minuten stehen gelassen. Die so lysierten Zellen wurden in die vorbereiteten Rundboden-Röhrchen überführt, geschüttelt und weitere 15 min auf Eis belassen.

Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (3000 g, 4 °C, 30 min), die dabei entstehende obere Phase wurde weitestgehend vollständig in 1 ml Isopropanol (Rundboden-Röhrchen) überführt, geschüttelt und für mind. 1 Stunde bei -80 °C gelagert. Das Präzipitat wird abzentrifugiert (3000 g, 4 °C, 30 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl Guanidiumthiocyanat-Mercaptoethanol-Lösung resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach Zugabe von jeweils 100 µl Isopropanol, wurde die Probe kräftig geschüttelt und über Nacht bei -20 °C gefällt.

Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (17500 g, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen und das Cup mit einem sterilen Wattestäbchen innen getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 10-20 µl DEPC-Wasser gelöst und bei –80 °C gelagert.

3.8.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

1 µl der zu untersuchenden RNA-Probe wurde 1:500 verdünnt (H₂O bidest.) und im UV-Spektrometer bei 260 / 280 nm die Absorption bestimmt.

Die Konzentration der RNA wurde nach folgender Gleichung ermittelt.

$\text{Konzentration (mg}\cdot\text{ml}^{-1}) = \frac{Abs_{260} \cdot R_f \cdot 500}{1000}$		
Abs ₂₆₀	=	Absorption der Probe bei 260 nm
R _f = 40	=	spezifischer RNA-Faktor
500 / 1000	=	Verdünnungsfaktoren

Zur weiteren Aufarbeitung wurden nur Proben mit einem Quotienten von Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ ≥ 1,6 verwendet.

3.8.3 Elektrophoretische Auftrennung der RNA

In der Horizontalkammer wurde ein Formaldehyd-Agarosegel wie folgt gegossen:

Agarose	1,5 g
10x MOPS	15 ml
H ₂ O bidest.	108 ml

Dieser Ansatz wurde in der Mikrowelle kurz aufgeköcht, auf ca. 60 °C abkühlen gelassen, mit 27 ml Formaldehyd versetzt und sofort gegossen. Die Aushärtung dauerte ca. 3 Stunden, nach einer Stunde wurde mit 1 l Laufpuffer (1x MOPS) überschichtet. Nach der Aushärtung konnte der Kamm entfernt werden.

Zum Auftragen der RNA-Proben wurde 20 µg RNA bzw. 2 µl RNA-Ladder (als Größenmarker) mit DEPC H₂O auf 6,6 µl aufgefüllt und mit 15 µl Denaturierungspuffer 10 Minuten auf 65 °C erhitzt. Danach wurden die Proben sofort für 5 Minuten auf Eis gestellt. Abschließend wurde mit 5 µl Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 18-40 V.

Abb. 3.5 zeigt exemplarisch die Auftrennung der RNA im Gel nach der Elektrophorese.

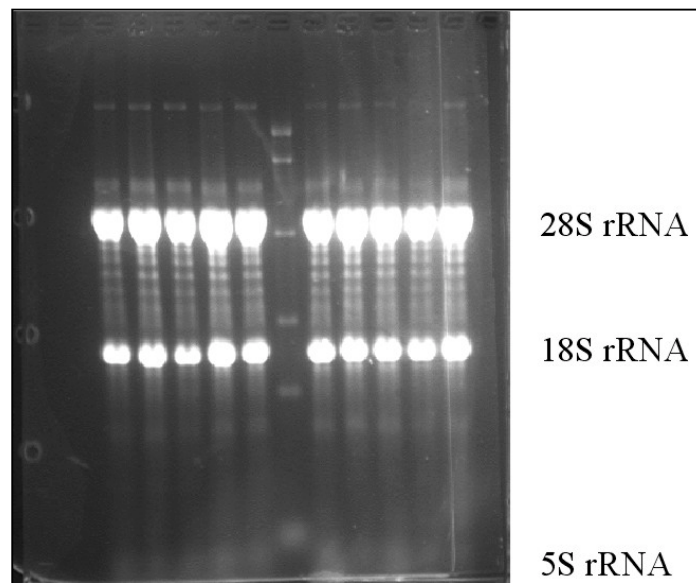


Abb. 3.5: elektrophoretische Auftrennung der RNA im Agarosegel

3.8.4 Northern-Blot

Eine Nylon-Membran in Gelgröße wurde für 15 Minuten in H_2O bidest. und anschließend für mindestens 15 Minuten in 10x SSC-Puffer äquilibriert. Das Gel wurde nach dem Lauf kurz in H_2O bidest. gelegt, um den Gehalt an Formaldehyd zu senken, der den Transfer behindern kann. Danach wurde das Gel kurzzeitig auf dem UV-Illuminator betrachtet, um die gleichmäßige Gelbeladung und die Intaktheit der RNA anhand der ribosomalen RNA-Banden zu beurteilen.

Der Transfer wurde nach der Kapillarmethode durchgeführt, die Blotting-Apparatur wurde in der in Abb. 3.6 angegeben Reihenfolge zusammengesetzt.

Zunächst wurde ein Glastrog mit Steg mit 10x SSC-Puffer gefüllt und ein Papierfilter-Docht aufgelegt (dieser und alle nachfolgenden Filterpapiere wurden mit 10x SSC-Puffer getränkt). Danach wurden 3 Filterpapiere blasenfrei aufgelegt (diese und die nachfolgenden Filterpapiere wurden von den Maßen her, etwas größer als das Gel zugeschnitten). Danach wurde das Agarosegel mit der Oberseite nach unten aufgelegt und eine Plastikfolie um das Gel herum gelegt. Abschließend wurden drei weitere Filterpapiere darauf gesetzt. Das Ganze wurde mit Zellstofftüchern überschichtet und mit einer austarierten Glasplatte mit einem 1 kg Gewicht belegt.

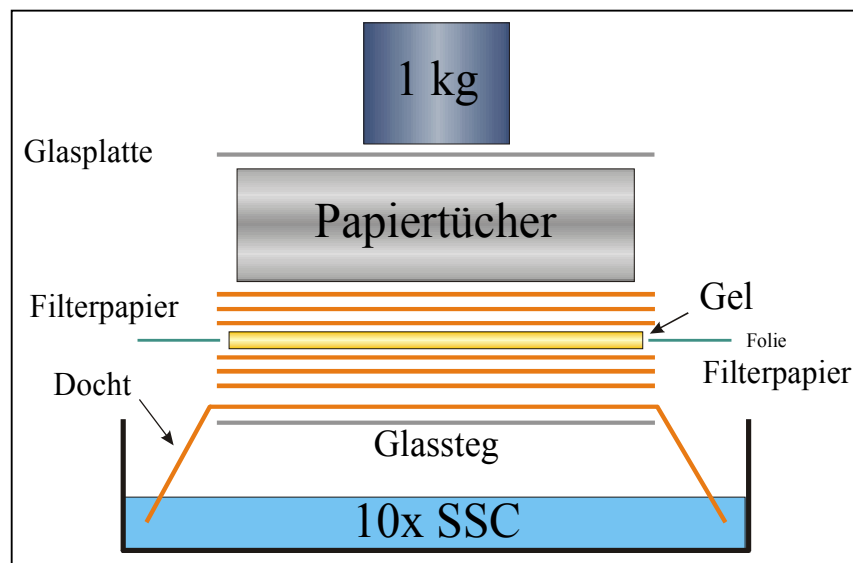


Abb. 3.6: skizzierter Aufbau der Blotting-Apparatur

Der Transfer dauerte mindestens 48 Stunden, wobei die durchnässten Zellstofftücher alle 12 Stunden durch neue ersetzt wurden. Nach erfolgreichem Transfer wurde das Gel auf dem UV-Illuminator betrachtet. Ein erfolgreicher Blot zeigte daraufhin keinerlei Spuren von RNA im Gel.

Die Membran wurde rasch mit 5x SSPE-Puffer gewaschen und die RNA im UV-Crosslinker mit $150 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ fixiert.

Die Membran wurde anschließend in Prähybridisierungspuffer in einer Hybridisierungstrommel im Hybridisierungssofen für mind. 24 Stunden bei 42°C gelagert.

3.8.5 Hybridisierung

Folgende cDNA-Sonden wurden verwendet:

CYP1A2-cDNA der Maus

Das 2 kbp-Fragment hybridisiert mit der CYP1A1 und CYP 1A2 mRNA von Mensch und Ratte (Gonzalez, 1984)

GAPDH-cDNA der Ratte

Das 249 bp große Fragment (Fort, 1985) diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele.

Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte nach der Random Primer-Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg, 1983). Benutzt wurde dazu ein Kit der Fa. Boehringer, das Klenow-Polymerase, einen Hexanukleotid-Primermix in Reaktionspuffer und einen Satz

dNTPs enthält. Das dCTP wurde durch [α - 32 P]-dCTP ersetzt, wobei für einen Ansatz 50 μ Ci eingesetzt wurden. Zunächst erfolgte die Hybridisierung der CYP1A2-cDNA und nach Entfernung dieser Sonde, die Rehybridisierung mit GAPDH-cDNA (s. Kap. 3.8.6).

Der Ansatz enthält (für drei Membranen):

18 μ l steriles H₂O bidest.

2 μ l (50 ng GAPDH-cDNA bzw. 500 ng CYP1A2-cDNA) entsprechende cDNA

Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und dann sofort 5 Minuten auf Eis gestellt.

Je 1 μ l dATP, dGTP und dTTP (je 0,5 mM)

2 μ l Primer-Mix

5 μ l [α - 32 P]-dCTP (50 μ Ci)

1 μ l Klenow-Enzym (1 U)

Dieser Ansatz wurde bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert, dann 10 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Dieser Ansatz kann auf bis zu drei Membranen in je einer Hybridisierungstrommel verteilt werden.

Nach mindestens 12 Stunden wurde die Membran aus der Trommel entnommen und diese zweimal mit Waschlösung geschüttelt (2-15 Minuten). Zeigte der aufgelegte Handmonitor eine Restaktivität <200 cpm an, war der Waschvorgang beendet und die unspezifische Aktivität weitestgehend entfernt.

Die Membran wurde in einfache Gefrierbeutel-Folie wasserdicht und luftblasenfrei eingeschweißt und bei -80 °C in eine Kodak-Kassette mit Röntgenfilm für 24 Stunden zur Belichtung gelagert.

Abschließend wurde der entwickelte Film eingescannt. Zur densitometrischen Auswertung wurde die Schwärzung des Röntgenfilms der einzelnen cDNA-Banden mittels der Software „TINA“ bestimmt und die einzelnen CYP1A –Banden in bezug zur GAPDH-Bande gesetzt.

3.8.6 Rehybridisierung

Um die Membran zur Ladekontrolle ein zweites Mal mit einer Sonde zu inkubieren, mußte die vorherige CYP1A1-cDNA-Sonde entfernt werden. Dies geschah durch zweimaliges Waschen der Membran in ca. 80 °C heißer 0,5 %iges SDS-Lösung, indem man die Membran bis zur Abkühlung auf RT darin schüttelt.

Danach wurde die Membran kurz in 5x SSPE-Puffer gewaschen, erneut für 24 Stunden in einer Trommel mit Hybridisierungslösung prähybridisiert und abschließend wie oben beschrieben mit der GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert.

3.9 Gewinnung von cDNA-Sonden

Die gewünschten cDNA-Sonden wurden durch Transformation der entsprechenden Plasmide in geeignete kompetente Bakterienstämme, Vermehrung dieser und anschließender Isolation gewonnen.

3.9.1 Transformation der Plasmide in kompetente Bakterien

Zur Transformation der Plasmide wurden 100 µl kompetente *E.coli* JM 109 (die Zellen wurden freundlicherweise von Frau R. Hussong bereit gestellt (Hussong, 1999)) mit 10 ng der entsprechenden Plasmid-DNA versetzt und zur Adsorption 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden die Ansätze für 90 Sekunden auf 42 °C im Wasserbad erhitzt (Hitzeschock führt zur Aufnahme der Plasmid-DNA) und weitere 5 Minuten auf Eis belassen. Danach wurden die Zellen in 900 µl antibiotikafreies LB-Medium gegeben und eine Stunde geschüttelt (200 rpm, 37 °C).

Anschließend wurden die Zellen einer Zentrifugation unterzogen (200 g, 5 min, RT) und 800 µl des Überstandes entfernt. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und mit einem Drygalski-Spatel auf zwei LB_{Amp}-Platten ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Mit diesem Schritt erfolgte eine Selektion der Zellen, die das Plasmid und folglich damit die Antibiotika-Resistenz aufgenommen hatten.

3.9.2 Vermehrung und Isolation der Plasmide

Plasmidhaltige Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 5 ml LB_{Amp} - Medium überführt und bei 37 °C über Nacht im Schüttler (200 rpm) inkubiert. Diese Vorkultur wurde danach in 500 ml LB_{Amp}-Medium gegeben und in einem Schikanekolben 24 Stunden (150 rpm, 37 °C) inkubiert.

Die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe eines Qiagen Mega-Kits und wurde nach der vom Hersteller vorgeschriebenen Methode durchgeführt.

3.9.3 Restriktionsverdau und DNA-Gelelektrophorese der Plasmid-DNA

Der Ansatz für den analytischen Restriktionsverdau wurde wie folgt angesetzt:

- 10 µg Plasmid
- 2 µl Enzym (Xba1 für GAPDH-Sonde und BamH1 für CYP1A2-Sonde)
- 1 µl Puffer (dem vom Hersteller entsprechend empfohlene)
- ad 10 µl steriles H₂O bidest.

Die DNA-Gelelektrophorese erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel (50 ml 1x TBE-Puffer, 10 µl Ethidiumbromid), das Gel wurde eine Stunde nach dem Gießen mit 1x TBE-Puffer überschichtet.

Neben einer Probe des obigen analytischen Restriktionsverdaus, wurde ebenfalls eine Probe des ungeschnittenen Plasmids und eine DNA-Ladder aufgetragen. Die weiteren Ansätze waren folgendermaßen zusammengesetzt:

- Ungeschnittenes Plasmid
 - 10 µl Plasmid
 - 1 µl 1x TBE-Puffer
 - ad 10 µl H₂O bidest.

- DNA-Ladder
 - 2 µl 1 kb DNA-Ladder
 - 8 µl 1x TBE-Puffer

Alle drei Ansätze wurden mit jeweils 5 µl Gel-Loading-Solution versetzt und bei 70 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Für den präparativen Verdau wurde folgender Ansatz verwendet:

- 200 µg Plasmid
- 400 U Enzym (Xba1 für GAPDH-Sonde und BamH1 für CYP1A2-Sonde)
- 20 µl Puffer (dem vom Hersteller entsprechend empfohlene)
- ad 200 µl steriles H₂O bidest.
- 50 µl Gel-Loading-Solution

- DNA-Ladder
 - 2 µl 1 kb DNA-Ladder
 - 8 µl 1x TBE-Puffer
 - 5 µl Gel-Loading-Solution

Die Ansätze wurden auf ein präparatives 1 %iges Low-Melting-Agarose-Gel aufgetragen. Dabei wurde der Ansatz mit der DNA-Ladder und 10 µl des Verdaus jeweils in die kleinen Taschen gefüllt, der Rest des Ansatzes in die große präparative Tasche des Gels.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die beiden kleinen Taschen mit Ladder und cDNA-Sonde abgeschnitten und im Ethidiumbromid-Bad 15 Minuten gefärbt und anschließend zehn Minuten im Wasserbad gewässert. Anhand dieser Referenz konnte nun der entsprechende Bereich mit der gewünschten Bande aus dem verbleibenden Gel ausgeschnitten werden. Dieses Gelstück wurde bis zur weiteren Isolation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.9.4 Isolierung der cDNA

In einem Falconröhrchen wurde die herausgeschnittene Gelbande bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad bis zum Schmelzen erhitzt, mit einem Volumenteil TE-Puffer versetzt, geschüttelt und auf mehrere Rundboden-Röhrchen verteilt. Danach wurden 0,5 Volumenteile Phenol zugesetzt und zur Phasentrennung zentrifugiert (8900 g, 30 min, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Der Überstand wurde in Rundboden-Röhrchen überführt und die verbleibende Phenolphase mit 3 ml H_2O bidest. versetzt, geschüttelt und erneut zentrifugiert. Die Überstände beider Zentrifugationen wurden vereinigt und mit dem gleichen Volumen einer Phenol/Chloroform-Mischung (Verhältnis 1:1) extrahiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (2000 g, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde die obere Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert und erneut zentrifugiert.

Der hierbei entstandene Überstand wurde gesammelt und mit dem gleichen Volumen n-Butanol versetzt, geschüttelt und stehengelassen. Nach erfolgter Phasentrennung wurde der Überstand verworfen und die untere Phase mit 0,1 Volumenanteil 3 M Natriumacetat-Puffer ($\text{pH} = 5,4$) und 2 Volumenanteilen Ethanol abs. versetzt und zur DNA-Fällung über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Danach wurden die Ansätze erneut zentrifugiert (8900 g, 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von ca. 1 ml verworfen, die Pellets resuspendiert, vereinigt und erneut zentrifugiert (8900 g, 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der Überstand wurde wiederum bis auf ein Restvolumen von ca. 1 ml verworfen, das Pellet resuspendiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert (17500 g, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der Überstand wurde weitestgehend entfernt, das erhaltene cDNA-Pellet luftgetrocknet, in 40 µl 1x TE-Puffer aufgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Quantifizierung der cDNA-Konzentration erfolgte durch die Bestimmung der Extinktion bei 260 nm im Photometer. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit H₂O bidest. geeignet verdünnt (in der Regel 1:500) und nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Konzentration (mg}\cdot\text{ml}^{-1}) = \frac{Abs_{260} \cdot D_f \cdot 500}{1000}$$

Abs_{260}	=	Absorption der Probe bei 260 nm
$D_f = 50$	=	spezifischer DNA-Faktor
$500 / 1000$	=	Verdünnungsfaktoren

Zur Reinheitskontrolle der isolierten cDNA wurde diese nochmals einer analytischen Gelelektrophorese unterworfen, Abb. 3.7 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

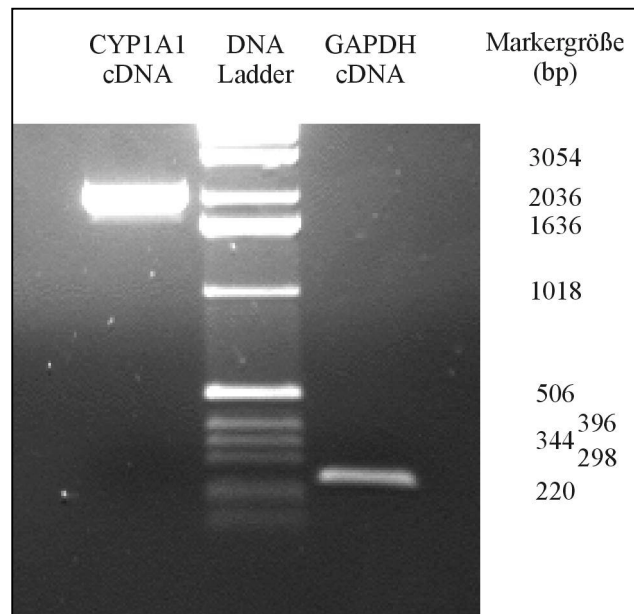


Abb. 3.7: analytische Gelelektrophorese der isolierten cDNA

3.10 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auszählung apoptotischer Kerne wurde an verschlüsselt codierten Objektträgern durchgeführt. Als Maß für die Apoptoseinzidenz diente die Anzahl apoptotischer Nuclei unter 1000 Kernen. In die Auszählung apoptotischer Zellkerne wurden Zellen mit stark kondensiertem Kern, Zellen mit halbmond- oder tropfenförmig kondensiertem Kern, sowie mit fragmentiertem Chromatin einbezogen (vgl. Abb. 1.4, S. 19 und Abb. 4.5, S. 71).

3.10.1 Statistik

Die Bestimmung der Apoptosefrequenz erfolgte in drei Versuchsreihen mit jeweiliger Doppelbestimmung. Es wurden jeweils unabhängig dreimal 1000 Kerne ausgezählt. Zur statistischen Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte aus den Versuchsreihen zur Signifikanz-Bestimmung einem Dunnet-Test unterzogen. Als schwach signifikant oder signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) bzw. $\leq 1\%$ ($p \leq 0,01$) angesehen.

3.11 Bestimmung der Cytotoxizität

Die Bestimmung der Cytotoxizität erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes Alamar Blue der Firma Serotec Limited. Hierbei handelt es sich um eine 440 μM Resazurin-Lösung (O'Brien, 2000). Dieser Farbstoff wird von intakten Zellen über einen bisher unbekannten Mechanismus zu Resorufin reduziert und kann anschließend fluoreszenzspektroskopisch detektiert werden.

Ratten-Hepatozyten wurden bei einer Dichte von 27.000 Zellen pro Milliliter auf kollagenierten 42-Well-Platten ausgesät. Die weitere Kultivierung und Behandlung der Zellen erfolgte analog zu den Beschreibungen für mikroskopische Untersuchungen in Kapitel 3.6.2 und 3.6.3.

Nach der Inkubation der Testsubstanzen wurde das Medium entfernt und durch frisches mit 10% Alamar Blue ersetzt. Nach 6 Stunden wurden die Platten im Plattenreader ausgewertet. Dabei wurde das Filterpaar 540 nm / 590 nm gewählt.

3.12 Bestimmung der Protein-Tyrosin-Kinase Aktivität

3.12.1 Präparation der subzellulären cytosolischen Fraktion

Zur Präparation der Leber einer männlichen Wistar-Ratte wurde eine Perfusion mit PBS-Lösung durchgeführt (vgl. Kap. 3.5.1). Die Leber wurde anschließend herauspräpariert und in eisgekühlten Tris-Sucrose-Puffer überführt. Die Leber wurde darin in ca. 1 g große Stücke geschnitten und in 3 ml Tris-Sucrose-Puffer mit Proteasehemmer (Aprotinin, EGTA, Leupeptin, Pepstatin und PMSF, jeweils 30 μl) überführt (eisgekühlt). Die Proben wurden wenn möglich sofort aufgearbeitet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Proben wurden mit einem Handhomogenisator (auf Eis) homogenisiert, anschließend zentrifugiert (9000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min) und der dabei gewonnene Überstand einer weiteren Zentrifugation unterworfen (100.000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min). Der Überstand (cytosolische Fraktion) wurde abgetrennt, eine Probe zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

entnommen (s. Kap. 3.7.2) und sofort als 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

3.12.2 c-Src selektiver Protein-Tyrosin-Kinase Assay

Die Durchführung des PTK-Assays erfolgte nach einer Vorschrift von Blankenship und Matsumura in veränderter Form (Blankenship, 1997).

Dieser Assay verwendet ein für c-Src selektives Substratpeptid mit einem Tyrosin als potentielle Phosphorylierungsstelle (Arg-Arg-Leu-Ile-Glu-Asp-Ala-Glu-Tyr-Ala-Ala-Arg-Gly), welches aus der Phosphorylierungsregion im c-Src hergeleitet ist. In Anwesenheit von [γ - 32 P]-ATP wird dieses Substratpeptid spezifisch am Tyrosin-Rest phosphoryliert.

Außerdem besitzen diese Substrate Argenin-Reste, die es bei einem sauren pH-Wert ermöglichen, die Peptide mittels Phosphocellulose-Papier (Witt, 1975) zu selektieren.

Die Menge an radioaktiv markiertem Tyrosin kann mittels eines Szintillations-Zählers detektiert werden.

Der Assay war folgendermaßen zusammengesetzt (auf Eis):

Ansatz A

20 µg Homogenat (cytosolische Fraktion)

0,05 µl Dioxin (600fache Konzentration) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle

ad 10 µl KDB (Kinase-Dilution-Buffer)

Ansatz B

2 µl Substratpeptid (1 mM Stammlösung in KAB) bzw KAB als Negativ-Kontrolle

1 µl ATP (3 mM, in KAB)

4 µCi [γ - 32 P]-ATP

ad 10 µl KAB (Kinase-Assay-Buffer)

Ansatz A wurde 10 min bei 30 °C vorinkubiert, danach wurde Ansatz B hinzugefügt und für eine weitere Minute bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der ganze Ansatz auf Phosphocellulose-Papier überführt, trocknen gelassen und dreimal in 85 mM Phosphorsäure geschwenkt (je 1 Minute). Abschließend wurde das Phosphocellulose-Papier kurz in Aceton geschüttelt, an der Luft getrocknet und in 4 ml Szintillations-Cocktail überführt.

Die Messung der Strahlung erfolgte im Szintillations-Zähler mit einem geräteinternen Programm für 32 P.

3.12.3 Qualitative Bestimmung des Phosphorylierungsgrades

Um eine qualitative Abschätzung der Kinaseaktivität im Cytosol oder Gesamthomogenat von primären Ratten-Hepatozyten zu erhalten, wurde das zuvor mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ vorinkubierte Homogenat elektrophoretisch im SDS-PAGE aufgetrennt und die Radioaktivität mittels Röntgenfilm detektiert (persönliche Mitteilung von E. Enan).

Cytosolische Fraktion von primären Ratten-Hepatozyten

Der Ansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 20 µg Homogenat (ad 10 µl KDB)
- 1 µl ATP (3 mM in KAB)
- 1 µCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$
- ad 20 µl Kinase-Assay-Buffer

Dieser Ansatz wurde 15 Minuten bei 30 °C inkubiert und anschließend mit 13 µl Lämmli-Puffer versetzt, gemischt, kurz anzentrifugiert und für 10 min bei 70 °C im Heizblock erhitzt.

Von dieser Mischung wurden 20 µl auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (s. Kap. 3.12.4) und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf dem Gelrockner getrocknet und ein aufgelegter Röntgenfilm in einer Kodak-Kassette 24 Stunden belichtet.

Gesamt-Homogenat von primären Ratten-Hepatozyten

Primäre Ratten-Hepatozyten wurden in $\text{NIH}_{\text{A/B}}$ -Medium kultiviert und mit TCDD bzw. DMSO 6 Stunden inkubiert (s. Kap. 3.6). Das Homogenat zweier gleichbehandelter Platten wurde in insgesamt 1000 µl Tris-Sucrose-Puffer (mit je 10 µl Proteasehemmer Aprotinin, EGTA, Leupeptin, PMSF und Pepstatin) resuspendiert und im Handhomogenisator auf Eis mit 10 Stößen „aufgebrochen“.

Die Gesamtproteinmenge wurde mittels des Verfahrens nach Lowry (s. Kap. 3.7.2) bestimmt.

Der Ansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 20 µg Gesamthomogenat (ad 10 µl KDB)
- 3 µCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$
- ad 20 µl Kinase-Assay-Buffer

Das weitere Vorgehen war analog der Beschreibung im oberen Abschnitt „cytosolische Fraktion“.

3.12.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Elektrophorese mittels SDS-PAGE erfolgte nach der Methode von Lämmli (Lämmli, 1970). Nach dem Zusammenbau der Elektrophoresekammer im Gießstand wurde zuerst das Trenngel mit einer Konzentration von 7 % gegossen.

Trenngel

H ₂ O bidest.	7550 µl
Tris / HCl (1,5 M, pH 8,8)	3750 µl
SDS (10%)	150 µl
Acrylamid/BIS (30 : 0,8 %)	3500 µl
APS (10%, frisch!)	50µl
TEMED	5 µl

Das Gel wurde mit 2 Tropfen n-Butanol überschichtet und 2 Stunden polymerisieren gelassen.

Die Butanolschicht wurde anschließend mit Filterpapier entfernt, mit etwas Sammelgel zweimal nachgespült und das Sammelgel in einer Konzentration von 4 % darüber geschichtet.

Sammelgel

H ₂ O bidest.	5800 µl
Tris / HCl (0,5 M, pH 6,8)	2500 µl
SDS (10 %)	100 µl
Acrylamid/BIS (30 : 0,8 %)	1400 µl
APS (10 %)	100 µl
TEMED	5 µl

Nach einer Aushärtungszeit von ca. 30 Minuten wurden die Gele im Elektrophoresetank mit Elektrodenpuffer überschichtet und die Kämme entfernt. Nach weiteren 30 Minuten wurden die Proben aufgetragen (jeweils 20 µl pro Tasche), parallel wurde eine Bahn mit 5 µl Rainbow-Marker beladen.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 10 mA, nach Erreichen des Trenngels wurde die Stromstärke variabel zwischen 15 und 40 mA eingestellt.

3.12.5 Western-Blotting

Der Transfer erfolgte nach der Methode von Towbin (1979) in der Variante des Semi-Dry-Verfahrens.

Die auf Gelgröße geschnittene PVDF-Membran wurde kurz in Mehtanol geschwenkt, dann in H₂O bidest. und anschließend in Anodenpuffer 2 mindestens jeweils 10 Minuten äquibriert. Filterpapiere wurden in der unten angegebenen Reihenfolge aufeinanderfolgend auf die Anoden-Grundplatte des Transfergerätes blasenfrei aufgelegt:

- 2 Papiere in Anodenpuffer I getränkt
- 1 Papier in Anodenpuffer II getränkt
- 1 PVDF-Membran (äquibriert)
- SDS-Polyacrylamidgel (direkt aus der Trennkammer)
- 3 Papiere in Kathodenpuffer getränkt

Der Kathodendeckel wurde aufgelegt und der Transfer bei 100 mA pro Gel für 90 min durchgeführt. Nach dem Abbau des Transfergerätes wurde die Membran kurz in TBS gewaschen.

Immundetektion

Die einzelnen Membranen wurden wie folgt bei RT geschüttelt:

- eine Stunden in 20 ml Blockierlösung
- 3 mal kurz und anschließend für 10 Minuten in TBS-Tween
- zwei Stunden in 5 ml Inkubationslösung (5 µl c-Src Antikörper)
- 3 mal kurz und anschließend für 10 Minuten in TBS-Tween
- eine Stunde in 20 ml Inkubationslösung (2 µl Anti-Maus-HRPOD)
- 3 mal kurz und anschließend für 10 Minuten in TBS-Tween

Die eigentliche Detektion erfolgte mit der ECL-Technik, die hier mit dem ECL-Plus-Kit der Fa. Amersham durchgeführt wurde.

Dieser enthält neben reaktionsverstärkenden Phenolen das eigentlich luminiszierende Luminol und H₂O₂. Bei der peroxidase-katalysierten Oxidation durch H₂O₂ emittiert Luminol im angeregten Zustand Licht der Wellenlänge 428 nm. Dies konnte mit Hilfe eines aufgelegten Röntgenfilms detektiert werden.

Der ECL-Plus-Kit wurde entsprechend der Firmenangaben verwendet. Der Röntgenfilm wurde ca. 1 Minute exponiert, dann entwickelt und fixiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Induktion der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase Aktivität

In diesem Teil der Arbeit wurde die induzierende Wirkung einzelner PCB-Kongenere auf die CYP1A vermittelte 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)–Aktivität bestimmt.

Die Inkubation der PCBs erfolgte für 48 Stunden in H4IIE-Medium. Nach erfolgter Aufarbeitung der behandelten Zellen (Kap. 3.6), konnte die Umsetzung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin, die als Maß für die CYP1A-Aktivität gilt, fluoreszenzspektroskopisch bewertet werden (Kap. 3.7).

Die nachfolgenden Kapitel stellen die gewonnenen Ergebnisse für die menschliche Hepatoblastom-Zelllinie HepG2, für primäre Rattenhepatozyten und für die Rattenhepatom Zelllinie H4IIE dar. Die Bewertung der gewonnenen Daten ist im Kapitel „Diskussion“ aufgeführt.

4.1.1 Hepatoblastom-Zelllinie HepG2

Die PCBs IUPAC No: 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189 und 2,3,7,8-TCDD als Referenzsubstanz wurden bezüglich der EROD-Induktion an der menschlichen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 untersucht. Im Anhang sind die hier verwendeten PCBs mit den jeweiligen Chlorierungspositionen schematisch aufgeführt (Kap. 8.2, S. 109).

Die Wirkung der PCBs 77, 81, 114, 126 und 2,3,7,8-TCDD als Referenzsubstanz auf die EROD-Aktivität (bezogen auf die Gesamthomogenatmenge) ist in Abb. 4.1 dargestellt (mit Standardfehler). Bei den PCBs 105, 118, 123, 156, 157, 167, 169 und 189 konnte keine EROD-Induktion beobachtet werden.

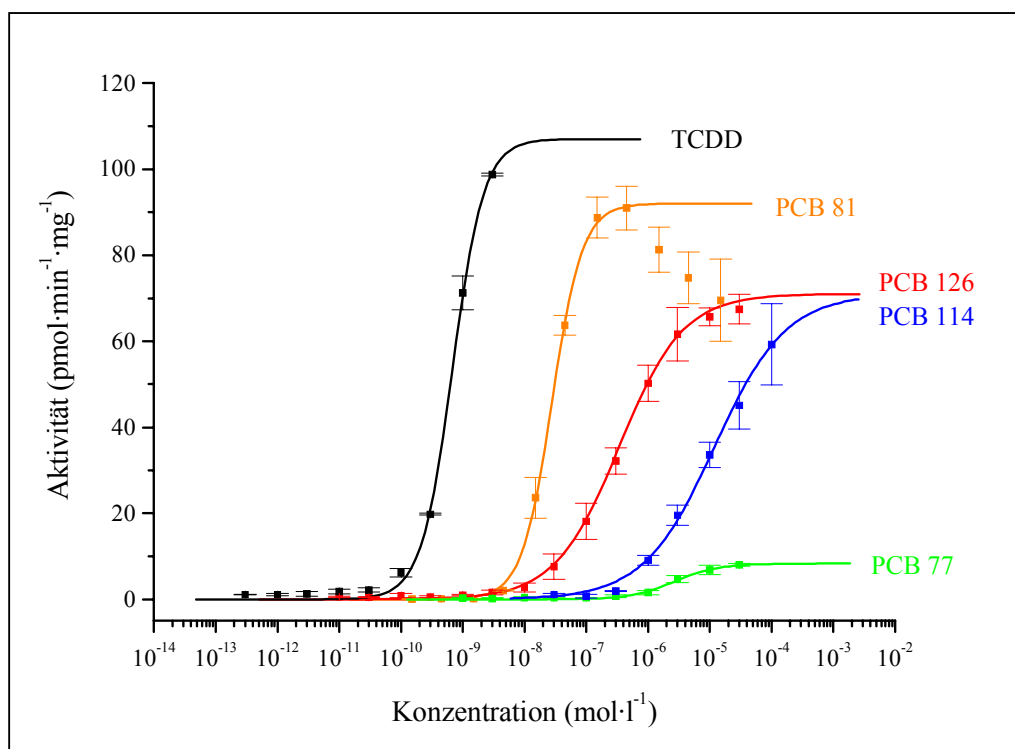


Abb. 4.1: Induktion der EROD-Aktivität durch PCB 77, 81, 114, 126 und 2,3,7,8-TCDD in HepG2-Zellen

Mit Hilfe der Software „Origin“ wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve für die einzelnen PCBs mittels sigmoidaler Anpassung ermittelt. Dabei wurden in diesem Fall für das PCB 81 die Meßpunkte bei höheren Konzentrationen, die einen deutlichen Abfall der EROD-Aktivität visualisieren, außer Acht gelassen.

Aus den hierbei gewonnenen Daten konnten die EC_{50} -Werte ermittelt werden (phänomenologisch die Wendepunkte, der oben dargestellten Kurvenverläufe). In Tab. 4.1 sind neben den EC_{50} -Werten zur statistischen Bewertung zusätzlich die jeweiligen 95%-Konfidenzintervalle ($p \leq 0,05$) mitaufgeführt.

Tab. 4.1: EC_{50} -Werte (nM) und 95%-Konfidenzintervall der EROD-Aktivität in HepG2-Zellen

Induktor	EC_{50} -Wert	95%-Konfidenzintervall
PCB 77 ⁿ	2700	± 230
PCB 81 ⁿ	28	$\pm 0,7$
PCB 114 ^m	12000	± 3700
PCB 126 ⁿ	340	± 10
TCDD	0,68	$\pm 0,02$

n = non-ortho
m = mono-ortho

Die EC_{50} -Werte der obigen Tabelle wurden zur Berechnung der „relative potencies“ REP-Werte herangezogen und sind in Tab. 4.2 aufgeführt. Diese wurden nach folgender Formel berechnet.

$$REP(x) = \frac{EC_{50}(TCDD)}{EC_{50}(x)}$$

Dem 2,3,7,8-TCDD kommt daher definitionsgemäß der $REP = 1$ zu.

Tab. 4.2: REP-Werte für HepG2-Zellen

Induktor	REP-Wert
PCB 77 ⁿ	0,003
PCB 81 ⁿ	0,02
PCB 114 ^m	0,00006
PCB 126 ⁿ	0,002
TCDD	1

ⁿ = non-ortho
^m = mono-ortho

4.1.2 Northern-Blot-Analyse

Zur Verifizierung der obigen Ergebnisse wurde für die menschliche Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt (Kap. 3.8). Sie sollte Aufschluß darüber geben, ob es sich bei der fehlenden Induktion der CYP1A-Isoenzyme durch die PCBs 105, 118, 123, 156, 157, 167, 169 und 189 um ein posttranscriptionales Ereignis handelt oder nicht.

Die Zellen wurden gleich den Bedingungen zur Messung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase Aktivität kultiviert und behandelt. Nach erfolgter Isolation der Gesamt-RNA wurde diese elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer CYP1A cDNA-Sonde bzw GAPDH cDNA-Sonde als Referenz behandelt.

In Abb. 4.2 sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung aufgeführt. Es konnte keine Erhöhung des CYP1A mRNA-Levels durch die PCBs 77, 105, 118, 123, 156, 157, 167, 169 und 189 detektiert werden. Die GAPDH-Kontrollen waren für diese PCBs positiv und sind hier nicht aufgeführt.

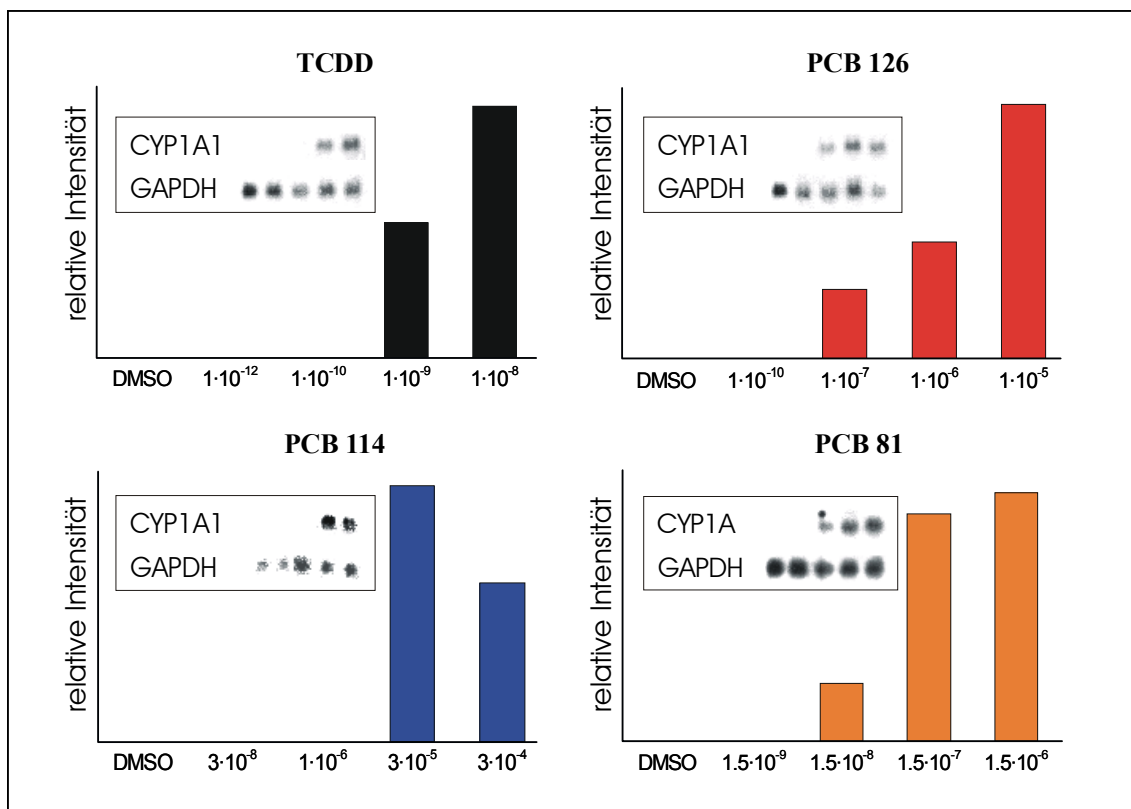


Abb. 4.2: Northern-Blot-Analyse der PCBs 81, 114, 126 und 2,3,7,8-TCDD

Zur densitometrischen Auswertung wurde die Schwärzung des Röntgenfilms der einzelnen cDNA-Banden mittels der Software „TINA“ bestimmt und die einzelnen CYP1A –Banden in Bezug zur entsprechenden GAPDH-Bande gesetzt.

4.1.3 Primäre Rattenhepatozyten

Zur Komplementierung bereits vorhandener Daten bezüglich der EROD-Induktion durch die PCBs IUPAC No: 77, 105, 118, 126, 169, 156 und 2,3,7,8-TCDD als Referenzsubstanz (Schmitz, 1995) sind in diesem und dem nachfolgenden Kapitel die Messungen der PCBs 81, 114, 123, 157, 167 und 189 für primäre Rattenhepatozyten und H4IIE-Zellen aufgeführt. Die Kultivierung und Behandlung der Zellen verlief analog der obigen Untersuchungen an HepG2-Zellen und den bereits veröffentlichten Daten.

In Abb. 4.3 sind die Meßpunkte (mit Standardfehler) und ihre sigmoidal-angepaßten Dosis-Wirkungskurven graphisch dargestellt.

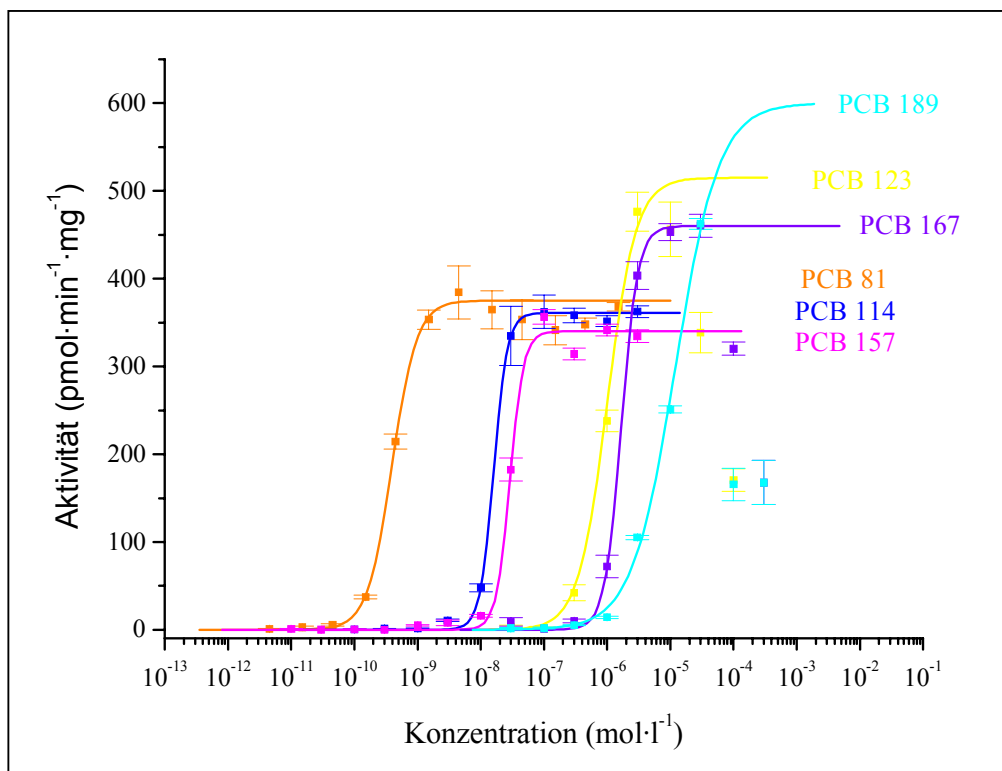


Abb. 4.3: Induktion der EROD-Aktivität durch PCB 81, 114, 123, 157, 167 und 189 in primären Rattenhepatozyten

Für die PCBs 123, 167 und 189 wurde ebenfalls ein starkes Abfallen der EROD-Aktivität bei höheren PCB-Konzentrationen gemessen. Diese Meßpunkte wurden nicht bei der Anpassung der sigmoidalen Kurven mit einbezogen. Für das PCB 189 mußte Software bedingt eine obere Grenze festgesetzt werden. Unter Berücksichtigung der Daten von Schmitz (1995) wurde hierfür ein Wert von 600 festgelegt (s. Diskussion). Der EC_{50} -Wert der sigmoidalen Kurve wurde hiervon nicht nennenswert beeinflusst.

In Tab. 4.3 sind die EC_{50} -Werte und das 95%-Konfidenzintervall für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen der einzelnen PCBs an primären Rattenhepatozyten aufgelistet.

Tab. 4.3: EC_{50} -Werte (nM) und 95%-Konfidenzintervall der EROD-Aktivität in primären Rattenhepatozyten

Induktor	EC_{50} -Wert	95%-Konfidenzintervall
PCB 81 ⁿ	0,41	± 0,01
PCB 114 ^m	16	± 0,5
PCB 123 ^m	1000	± 73
PCB 157 ^m	29	± 1,4
PCB 167 ^m	1670	± 36
PCB 189 ^m	12100	± 6880

n = non-ortho ; m = mono-ortho

In der nachfolgenden Tabelle sind die aus den gewonnen EC_{50} -Werten berechneten REP-Werte aufgeführt. Zur Bestimmung dieser Angaben wurde für 2,3,7,8-TCDD der $EC_{50} = 0,02$ nM von H. J. Schmitz (1995) übernommen. Eigene, im Umfang reduzierte Messungen (nicht aufgeführt) mit 2,3,7,8-TCDD bestätigten die Vergleichbarkeit der Experimente.

Tab. 4.4: REP-Werte für primäre Rattenhepatozyten

Induktor	REP-Wert
PCB 81 ⁿ	0,05
PCB 114 ^m	0,001
PCB 123 ^m	0,00002
PCB 157 ^m	0,0007
PCB 167 ^m	0,00001
PCB 189 ^m	0,000002

n = non-ortho
m = mono-ortho

4.1.4 Rattenhepatom-Zelllinie H4IIE

Abschließend wurden die PCBs IUPAC No: 81, 114, 123, 157, 167 und 189 bezüglich der Induktion der EROD-Aktivität an der Rattenhepatom-Zelllinie H4IIE untersucht.

In Abb. 4.4 sind diese Daten (mit Standardfehler) und die angepassten sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven dargestellt. Keine 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase Aktivität konnte für das mono-*ortho* substituierte Kongener PCB 189 detektiert werden.

Für die PCBs 114 und 157 wurden bei höheren PCB-Konzentrationen starke Erniedrigungen der EROD-Aktivität festgestellt. Diese wurden für die sigmoidale Anpassung nicht berücksichtigt.

Die daraus resultierenden EC_{50} -Werte und REP-Werte sind in den nachfolgenden Tabellen (Tab. 4.6) aufgeführt. Für die Berechnung der „relative-pontencies“ (REP-Werte) wurde der $EC_{50} = 0,05$ nM für 2,3,7,8-TCDD aus der Arbeit von H.J. Schmitz (1995) zugrunde gelegt (nicht aufgeführte eigene Messungen, bestätigen die Zulässigkeit dieses Schrittes und die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsreihen).

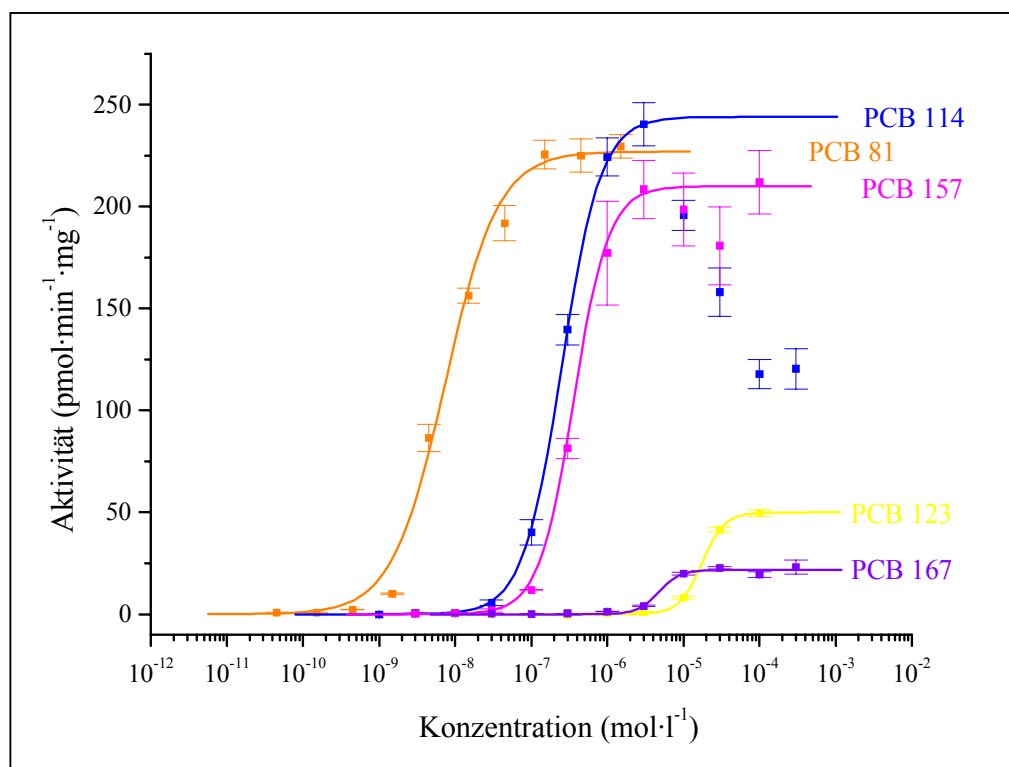


Abb. 4.4: Induktion der EROD-Aktivität durch PCB 81, 114, 123, 157 und 167 in H4IIE-Zellen

Tab. 4.5: EC_{50} -Werte (nM) und 95%-Konfidenzintervall der EROD-Aktivität in H4IIE-Zellen

Induktor	EC_{50} -Wert	95%-Konfidenzintervall
PCB 81 ⁿ	7,41	$\pm 1,1$
PCB 114 ^m	253	± 1
PCB 123 ^m	17500	± 347
PCB 157 ^m	361	± 38
PCB 167 ^m	1470	± 603

n = non-ortho

m = mono-ortho

Tab. 4.6: REP-Werte für H4IIE-Zellen

Induktor	REP-Wert
PCB 81 ⁿ	0,007
PCB 114 ^m	0,0002
PCB 123 ^m	0,000003
PCB 157 ^m	0,0001
PCB 167 ^m	0,00001

n = non-ortho

m = mono-ortho

4.2 Beeinflussung der Apoptose durch PCB 81, 126 und 169

Von den der WHO als „dioxinartig“ eingestuften zwölf PCBs (Van den Berg, 1998) wurden die PCBs 81, 126 und 169 ausgewählt und auf die Beeinflussung der Apoptose in primären Rattenhepatozyten hin untersucht. Bei den ausgewählten PCBs handelt es sich um die in primären Rattenhepatozyten am stärksten CYP1A-Isoenzym induzierenden Kongenere in unseren Experimenten (vorliegende Arbeit und H. J. Schmitz (1995)).

Die primären Rattenhepatozyten wurden auf kollagenierten Objektträgern mit den PCBs 81, 126 und 169 für 6 Stunden inkubiert. Bei der Hälfte der Proben wurde vor der Inkubation mittels UV-Strahlung ($90 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$) Apoptose induziert (Kap. 3.6.3). Nach erfolgter Fixierung und Färbung der Zellen mit DAPI / Sulforhodamin 101 (Kap. 3.6.5) konnte der Anteil der apoptotischen Zellen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt werden.

Hierbei war es möglich, eine PCB-abhängige Beeinflussung der basalen Apoptose (unbestrahlte Probe) bzw. Veränderung der Apoptoseinzidenz bei apoptoseinduzierten Zellen (bestrahlte Probe) zu bestimmen.

Zur Bestimmung der Apoptosehäufigkeit wurde die Anzahl von Kernen mit folgenden apoptotischen Charakteristika unter 1000 Kernen visuell erfaßt:

- Zellen mit stark kondensiertem Zellkern (Abb. 4.5 rechts)
- geschrumpfte Zellen mit fragmentiertem Zellkern (Abb. 4.5 links)
- Zellen mit halbmond- oder tropfenförmigem Zellkern (Abb. 1.4, S. 19)

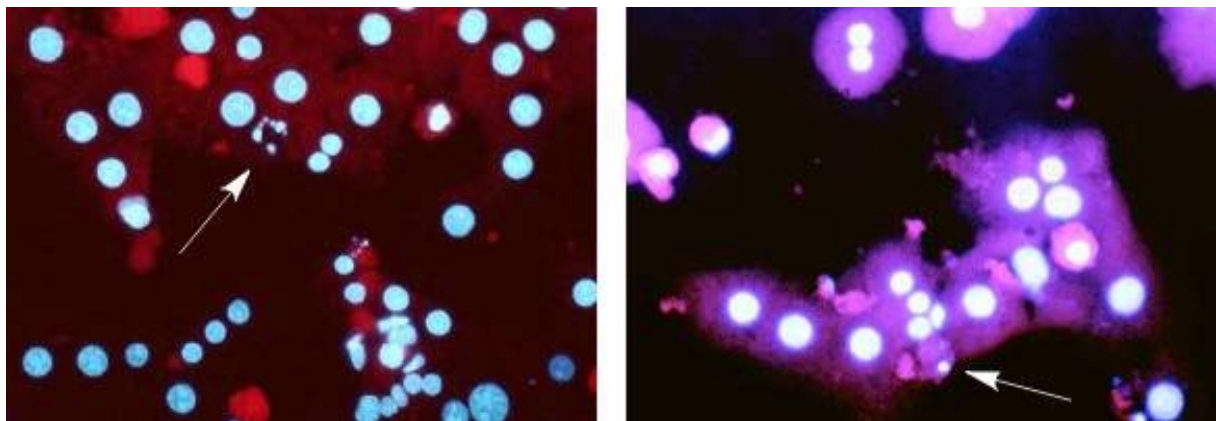


Abb. 4.5: Beispiele für fragmentierte (links) und kondensierte (rechts) Zellkerne

4.2.1 Beeinflussung der basalen Apoptose durch die PCBs 81, 126 und 169

Bei allen Versuchsreihen wurde insgesamt eine durchschnittliche Apoptose der DMSO-Kontrolle von ca. 2,5 % beobachtet.

Es wurden drei unabhängige Experimente mit jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt. Die DMSO-Kontrolle ist der Mittelwert aus allen durchgeführten Versuchen (N=9).

Für die PCBs 81, 126 und 169 sind in den nachfolgenden Abbildungen die Ergebnisse, neben den Standardabweichungen und die Resultate des Signifikanztests (Dunnet-Test, * schwach signifikant, ** signifikant) aufgeführt.

Für das PCB 81 (Abb. 4.6) wurde eine maximale Induktion der Apoptose bei einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-8}$ M beobachtet (3,5 % Apoptoseinzidenz). Bei weiterer Steigerung der PCB-Konzentration wurde ein Abfall der Apoptoserate beobachtet.

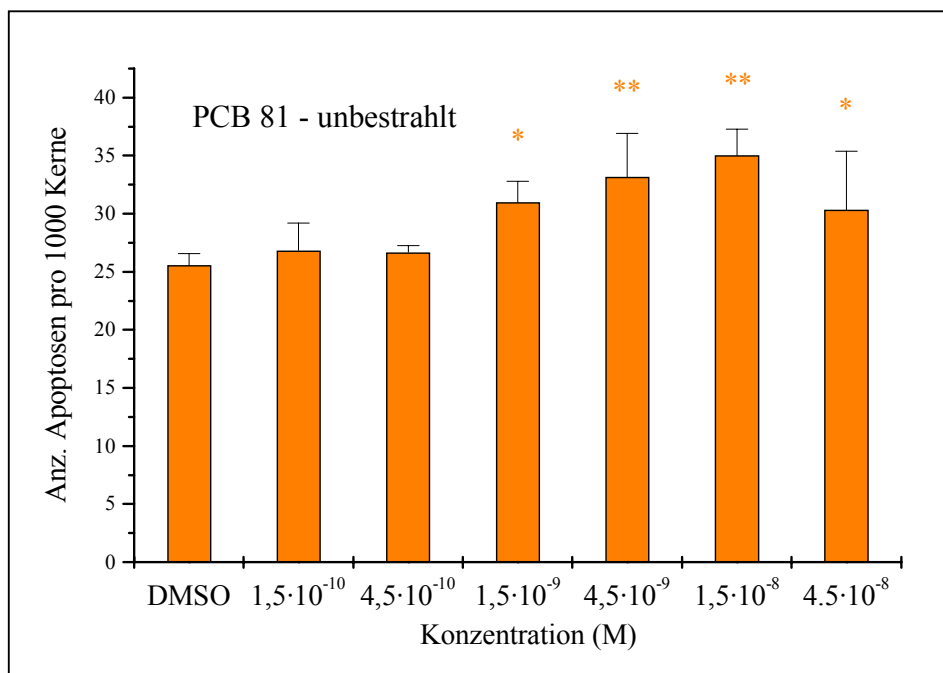


Abb. 4.6: Veränderung der basalen Apoptose durch PCB 81 (Meßdaten mit Standardabweichung und Signifikanz)

Für das PCB 126 (Abb. 4.7) wurde für die untersuchten Konzentrationen eine kontinuierliche Steigerung der Apoptoserate beobachtet (Apoptoserate 3,5% bei $c = 1 \cdot 10^{-7}$ M).

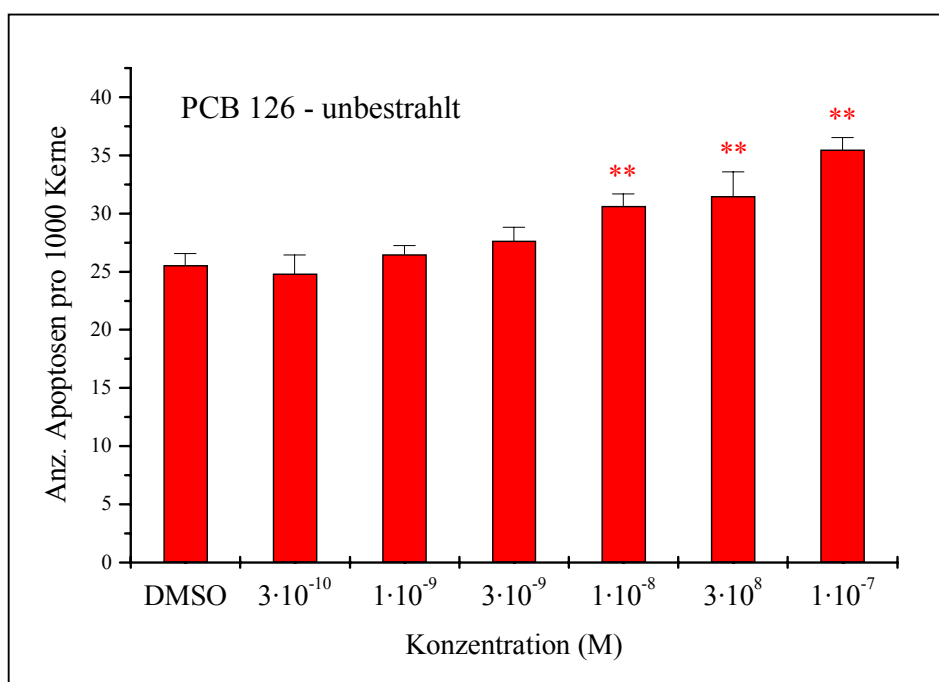


Abb. 4.7: Veränderung der basalen Apoptose durch PCB 126 (Meßdaten mit Standardabweichung und Signifikanz)

Für das PCB 169 konnte keine Veränderung der Apoptose bei steigenden Substanzkonzentrationen beobachtet werden.

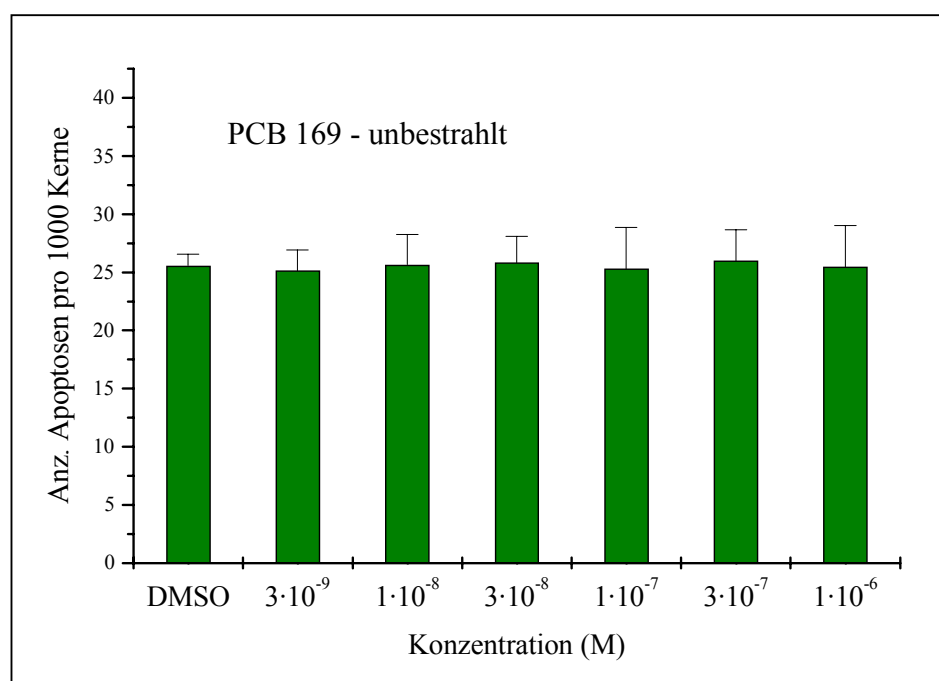


Abb. 4.8: Veränderung der basalen Apoptose durch PCB 169 (Meßdaten mit Standardabweichung und Signifikanz)

Die Tabelle stellt die Daten für die Beeinflussung der basalen Apoptose in Abhängigkeit der Konzentrationen der PCBs 81, 126 und 169 noch einmal im Überblick dar. Aufgeführt sind lediglich die einzelnen Apoptoseraten und der Grad der Signifikanz.

Tab. 4.7: Veränderung der basalen Apoptose in Abhängigkeit der PCBs 81, 126 und 169 (DMSO-Kontrolle bei 25,6)

Anzahl der Apoptosen pro 1000 Kerne					
PCB 81 (M)		PCB 126 (M)		PCB 169 (M)	
$1,5 \cdot 10^{-10}$	26,8	$3 \cdot 10^{-10}$	24,8	$3 \cdot 10^{-9}$	25,2
$4,5 \cdot 10^{-10}$	26,7	$1 \cdot 10^{-9}$	26,5	$1 \cdot 10^{-8}$	25,7
$1,5 \cdot 10^{-9}$	31,0 *	$3 \cdot 10^{-9}$	27,7	$3 \cdot 10^{-8}$	25,8
$4,5 \cdot 10^{-9}$	33,2 **	$1 \cdot 10^{-8}$	30,7 **	$1 \cdot 10^{-7}$	25,3
$1,5 \cdot 10^{-8}$	35,0 **	$3 \cdot 10^{-8}$	31,5 **	$3 \cdot 10^{-7}$	26,0
$4,5 \cdot 10^{-8}$	30,3 *	$1 \cdot 10^{-7}$	35,5 **	$1 \cdot 10^{-6}$	25,5

4.2.2 Beeinflussung der induzierten Apoptose durch die PCBs 81, 126 und 169

In den folgenden Experimenten wurde die Apoptose durch UV-Bestrahlung ($90 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$) induziert. Bei allen Versuchsreihen wurde insgesamt eine durchschnittliche induzierte Apoptoserate der DMSO-Kontrolle von ca. 3,7 % beobachtet.

Es wurden drei unabhängige Experimente mit jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt. Die DMSO-Kontrolle ist der Mittelwert aus allen durchgeführten Versuchen (N=9).

Für die PCBs 81, 126 und 169 sind in den nachfolgenden Abbildungen die Ergebnisse, neben den Standardabweichungen und die Resultate des Signifikanztests (Dunnet-Test) aufgeführt.

In Abb. 4.9 sind die Ergebnisse für das PCB 81 dargestellt. Es wurde bei steigenden Konzentrationen eine signifikante Hemmung der Apoptose beobachtet. Bei einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ wurde ein erneuter Anstieg der Apoptose detektiert, dem ein Absinken der Apoptoserate folgte. Das Minimum der Apoptosezahl wurde bei $1,5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ mit einer Inzidenz von 2,3% beobachtet.

Für das PCB 126 (Abb. 4.10) wurde ein ähnlicher Verlauf der Apoptoserate in Abhängigkeit der PCB-Konzentration beobachtet. Das Maximum der Hemmung wurde innerhalb der verwendeten Konzentrationen bei $c = 3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ beobachtet (Apoptose bei 2,7%).

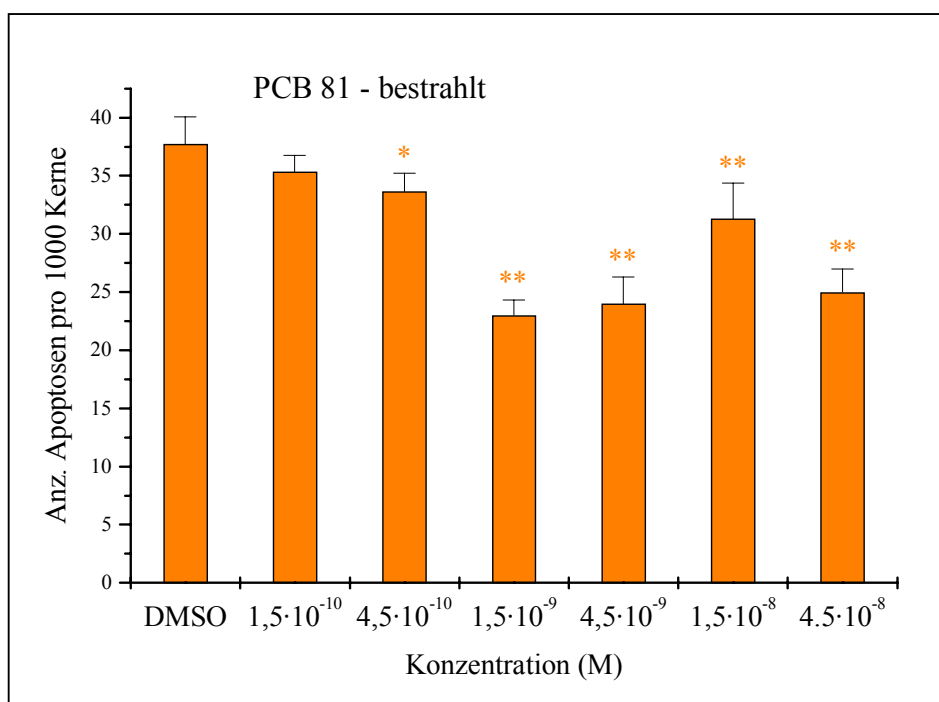


Abb. 4.9: Veränderung der induzierten Apoptose durch PCB 81 (Meßdaten mit Standardabweichung und Signifikanz)

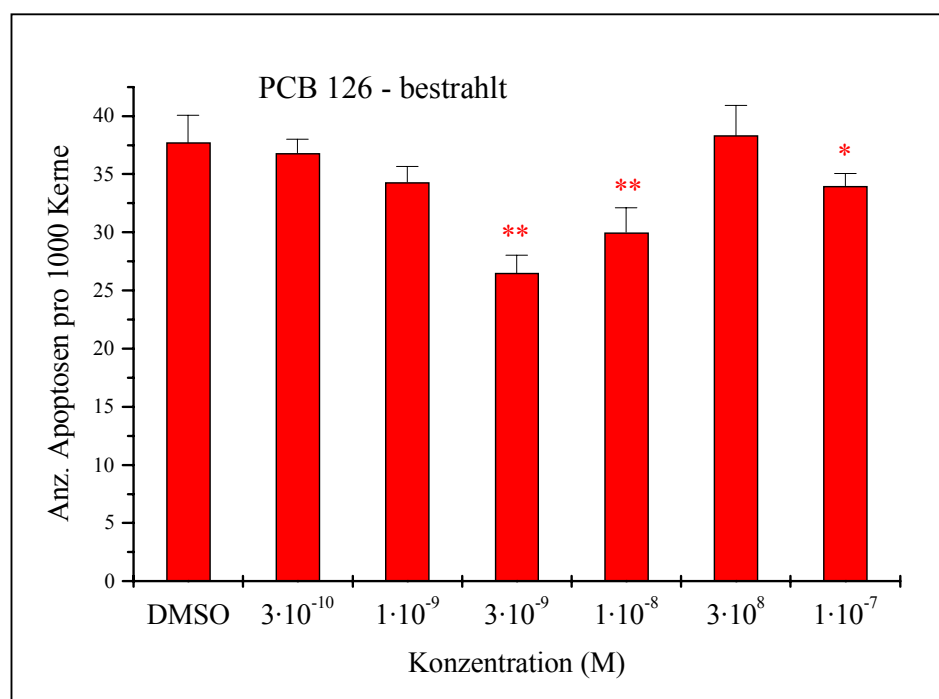


Abb. 4.10: Veränderung der induzierten Apoptose durch PCB 126 (Meßdaten mit Standardabweichung und Signifikanz)

In Abb. 4.11 sind die Daten für das PCB 169 dargestellt. Auch hier wurde zunächst eine Hemmung der Apoptose bis zu einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M beobachtet. Eine verminderte Hemmung bei $c = 3 \cdot 10^{-7}$ M und wiederum eine stärkere Hemmung bei der letzten Konzentration, setzten den bisher beobachteten „Trend“ fort.

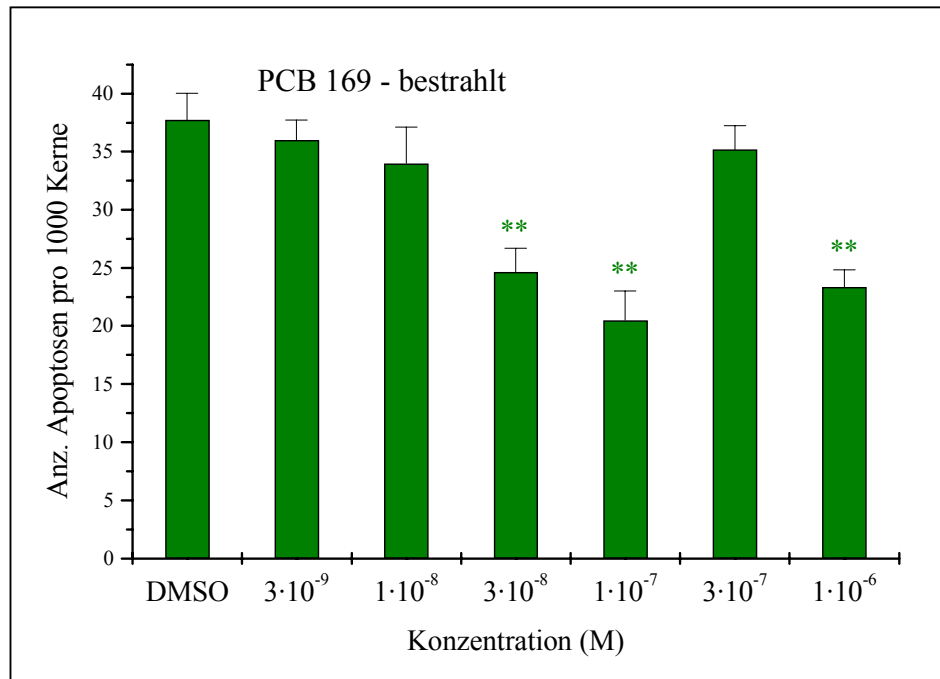


Abb. 4.11: Veränderung der induzierten Apoptose durch PCB 169 (Meßdaten mit Standardabweichung und Signifikanz)

Abschließend stellt die nachfolgende Tabelle die Ergebnisse noch einmal im Überblick dar.

Tab. 4.8: Beeinflussung der induzierten Apoptose in Abhängigkeit der PCBs 81, 126 und 169 (DMSO-Kontrolle bei 37,7)

Anzahl der Apoptosen pro 1000 Kerne					
PCB 81 (M)		PCB 126 (M)		PCB 169 (M)	
$1,5 \cdot 10^{-10}$	35,3	$3 \cdot 10^{-10}$	36,8	$3 \cdot 10^{-9}$	36,0
$4,5 \cdot 10^{-10}$	33,7 *	$1 \cdot 10^{-9}$	34,3	$1 \cdot 10^{-8}$	34,0
$1,5 \cdot 10^{-9}$	23,0 **	$3 \cdot 10^{-9}$	26,5 **	$3 \cdot 10^{-8}$	24,7 **
$4,5 \cdot 10^{-9}$	24,0 **	$1 \cdot 10^{-8}$	30,0 **	$1 \cdot 10^{-7}$	20,5 **
$1,5 \cdot 10^{-8}$	31,3 **	$3 \cdot 10^{-8}$	38,3	$3 \cdot 10^{-7}$	35,2
$4,5 \cdot 10^{-8}$	25,0 **	$1 \cdot 10^{-7}$	34,0 *	$1 \cdot 10^{-6}$	23,3 **

4.2.3 CYP1A-Inhibitor 8-Methoxypsoralen

Um einen möglichen Einfluß der induzierten CYP1A-Aktivität auf die Apoptoserate beurteilen zu können, wurden die obigen Experimente mit dem PCB 126 analog unter Einsatz des CYP1A-Inhibitors 8-Methoxypsoralen durchgeführt. Hierfür wurde für eine Abschätzung das PCB 126 in einer Konzentration von $c = 3 \cdot 10^{-8}$ M eingesetzt und die Apoptoserate mit bzw. ohne UV-Bestrahlung ermittelt. Die nachfolgend Abbildung stellt die gefunden Ergebnisse graphisch dar.

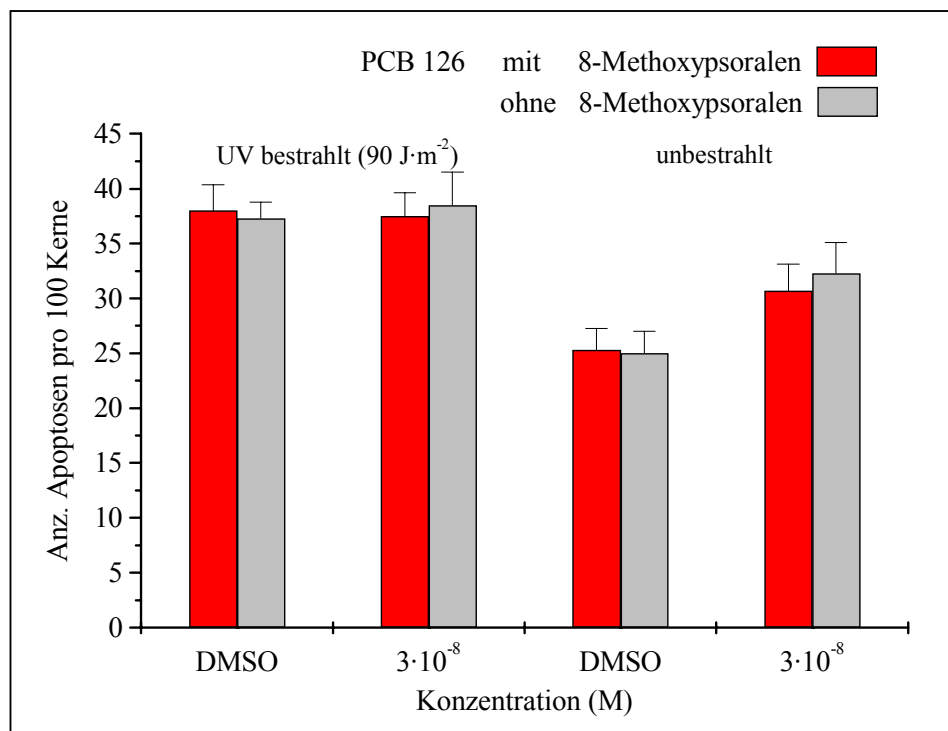


Abb. 4.12: Beeinflussung der induzierten bzw. basalen Apoptose durch PCB 126 kombiniert mit einem CYP1A-Inhibitor

4.2.4 Cytotoxizität der PCBs 81, 126 und 169 an primären Rattenhepatozyten

Im Rahmen der Untersuchung der PCBs 81, 126 und 169 auf die Beeinflussung der Apoptose, sollte die Frage der Cytotoxizität für diese PCBs an primären Rattenhepatozyten geklärt werden. Die Beantwortung der Frage stellt eine mögliche Erklärung für beobachtete Phänomene bei den Apoptose-Experimenten dar.

Mit Hilfe des Farbstoffes Alamar Blue der Firma Serotec Limited konnte die Cytotoxizität der PCBs bei verschiedenen Konzentrationen untersucht werden. Die fluoreszenzspektroskopische Detektion der Umsetzung des Farbstoffes zu Resorufin ist ein Maß für die Vitalität der Zellen.

Die primären Rattenhepatozyten wurden analog der Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Apoptose kultiviert und behandelt (Kap. 3.11). Nach 6 stündiger Inkubation mit den ausgewählten PBCs wurde das Medium durch neues Medium, dem Almar Blue zugesetzt war, ersetzt. Die qualitative Messung des Resorufins erfolgte nach weiteren 6 Stunden.

In Abb. 4.13 sind die Ergebnisse für die Beeinflussung der Cytotoxizität bei unbestrahlten Zellen dargestellt (Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen). Ausgewählt wurden die vier höchsten Konzentrationen, die bei den obigen Versuchen zum Einsatz kamen.

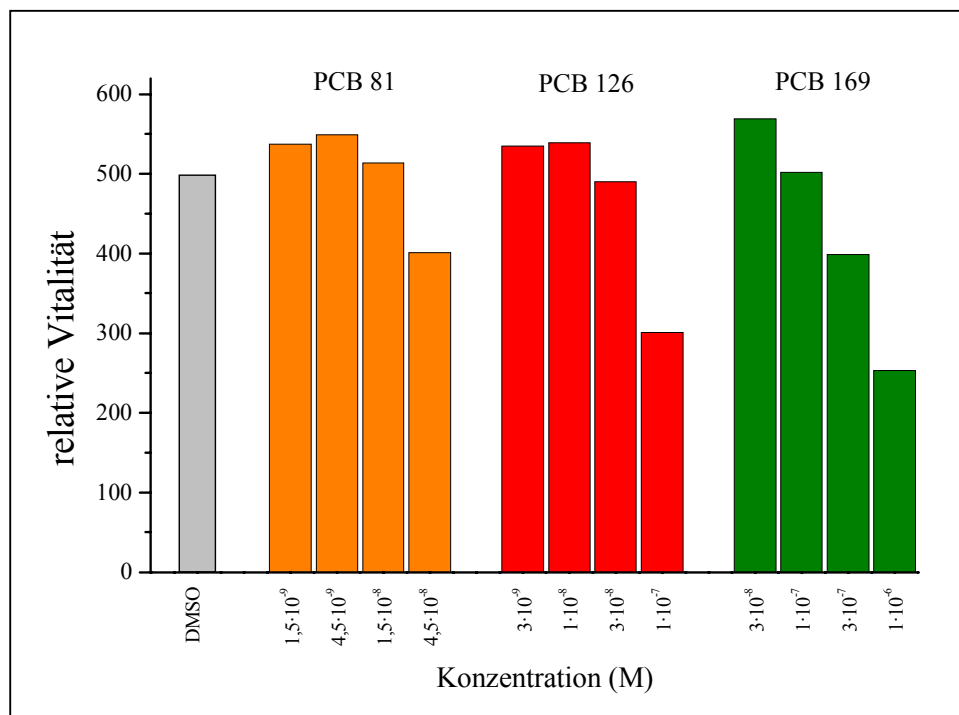


Abb. 4.13: Cytotoxizität der PCBs 81, 126 und 169 in primären Rattenhepatozyten

Es zeigte sich, daß alle PCBs bei höheren Konzentrationen einen Abfall der Vitalität der primären Rattenhepatozyten bewirkten. Sehr deutlich war diese Wirkung beim PCB 169 zu beobachten.

Die Versuche wurden mit UV bestrahlten Zellen ($90 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$) wiederholt. Die nachfolgende Abbildung stellt die gewonnenen Ergebnisse graphisch dar.

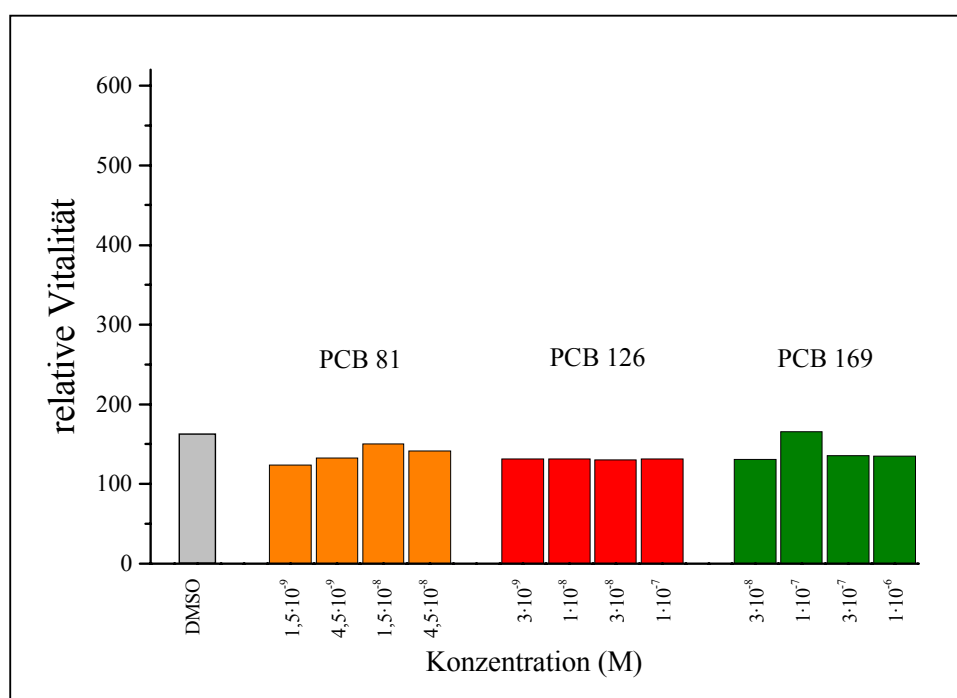


Abb. 4.14: Cytotoxizität der PCBs 81, 126 und 169 in primären Rattenhepatozyten (UV-bestrahlt $90 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$)

Hier zeigte sich schon bei der DMSO-Kontrolle eine gegenüber den unbestrahlten Proben (Abb. 4.13) deutlich reduzierte Vitalität. Cytotoxische Effekte in Abhängigkeit von der Konzentration der PCBs konnten nicht beobachtet werden.

Eine nicht aufgeführte Parallelmessung zeigte, daß das Medium allein schon eine Umsetzung des Farbstoffs Alamar Blue zu Resorufin bewirkte. Diese Umsetzung lag in einer Größenordnung des oben aufgeführten DMSO-Kontrollwertes, so daß praktisch keine Umsetzung des Farbstoffs durch die Zellen beobachtet wurde.

4.3 Bestimmung der Protein-Tyrosin-Kinase Aktivität

4.3.1 Beeinflussung der c-Src-Aktivität durch 2,3,7,8-TCDD

Die Abhängigkeit der c-Src Phosphorylierungs-Aktivität in Abhängigkeit von der 2,3,7,8-TCDD-Konzentration sollte analog der Methode von Blankenship (1997) durchgeführt werden.

In Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ sollte ein c-Src selektives Substrat phosphoryliert werden und dieses mittels Phosphocellulose-Papier isoliert werden. Anschließend kann die Menge an radioaktiv markierten Substrat im Szintillations-Zähler bestimmt werden.

Zunächst wurde aus primären Rattenhepatozyten das Cytosol isoliert. Gleiche Mengen des Homogenats wurden mit TCDD behandelt, 10 Minuten bei 30 °C vorinkubiert und anschließend das Substrat hinzugefügt. Parallel hierzu wurde jeweils eine Probe ohne Substrat unter gleichen Bedingungen mitgeführt und gemessen. Der Versuch wurde zweimal wiederholt. In Abb. 4.15 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

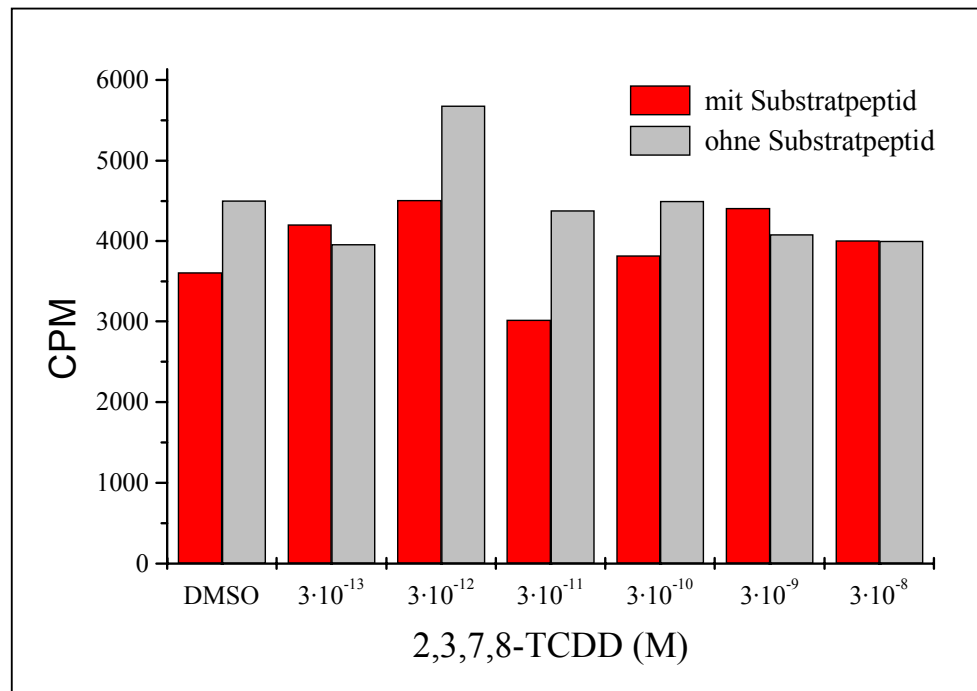


Abb. 4.15: Detektion der Protein-Tyrosin-Kinase Aktivität mittels eines c-Src selektiven Substratpeptids in Abhängigkeit von 2,3,7,8-TCDD

Wie aus der obigen Abbildung ersichtlich, konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Abhängigkeit der Phosphorylierungs-Aktivität in der cytosolischen Fraktion detektiert werden. Auch eine Tendenz läßt sich bei den aufgezeigten Schwankungen nicht erkennen.

Um prinzipielle Fehler im Versuchsansatz auszuschließen, wurden mehrere Experimente zur Verifizierung durchgeführt.

Hierzu wurde das cytosolische Homogenat über SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines c-Src Antikörpers konnte im Western-Blot nachgewiesen werden, daß im Homogenat generell Src-Protein vorhanden war (Abb. 4.16). Der Antikörper war nicht spezifisch genug, deshalb sind neben der deutlich verstärkten Bande bei 60 kDa auch weitere Banden zu erkennen.

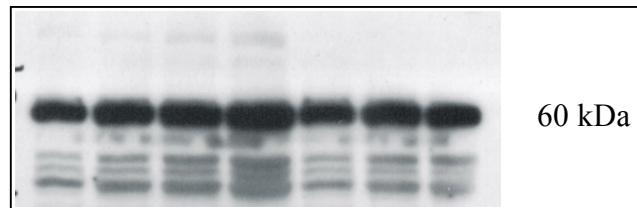


Abb. 4.16: Untersuchung der cytosolischen Fraktion mittels Western-Blot Technik auf c-Src

Um zu prüfen, ob die cytosolische Fraktion generell Enzymaktivität zeigt, wurde das cytosolische Homogenat analog der Versuchsbedingungen für die Messung der PTK-Aktivität ohne Substratpeptid behandelt (ATP / [γ - 32 P]-ATP-Mix) und anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und mit einem Röntgenfilm in einer Belichtungskassette aufbewahrt (Kap. 3.12.3).

Nach 24 Stunden Belichtungszeit wurde der Film entwickelt und fixiert. Das Ergebnis ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

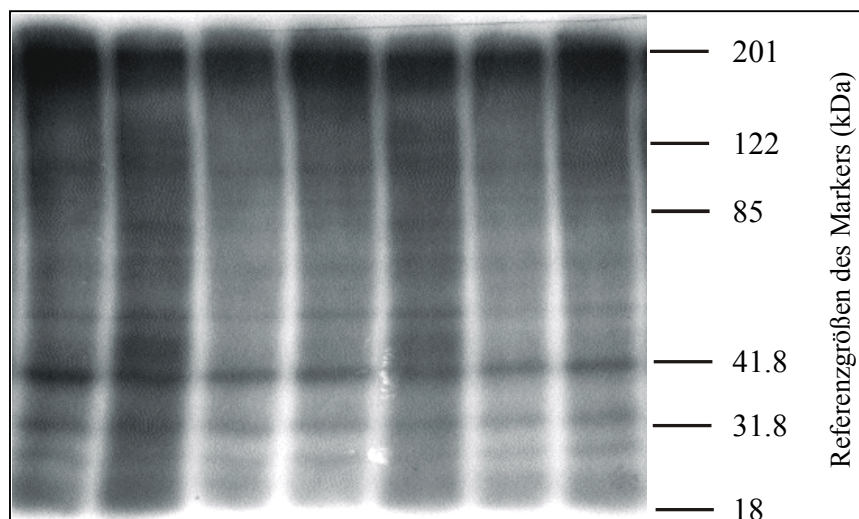


Abb. 4.17: Qualitative Bewertung der Phosphorylierungs-Aktivität der cytosolischen Fraktion

Es ist deutlich eine über den gesamten Bereich des SDS-PAGE-Gels verteilte Phosphorylierungs-Aktivität zu erkennen. Damit konnte von einem aktiven Homogenat ausgegangen werden.

Um zu sehen, ob mit Hilfe der Meßapparatur zur Bestimmung der Radioaktivität (Szintillations-Zähler und -Flüssigkeit) prinzipiell im Bereich um die 10.000 cpm eine vergleichende Aussage machbar ist, wurde eine Art Verdünnungsreihe von [γ - 32 P]-ATP angefertigt.

Hierzu wurde eine Phosphatlösung (140 μM) mit 4 μCi [γ - ^{32}P]-ATP versetzt. Anschließend wurde über eine Verdünnungsreihe eine definierte Menge auf Phosphocellulose-Papier aufgespritzt, trocknen gelassen und die Radioaktivität im Szintillations-Zähler vermessen (Abb. 4.18). Eine Probe nur mit Szintialltionsflüssigkeit ergab einen „Leerwert“ von 697 cpm.

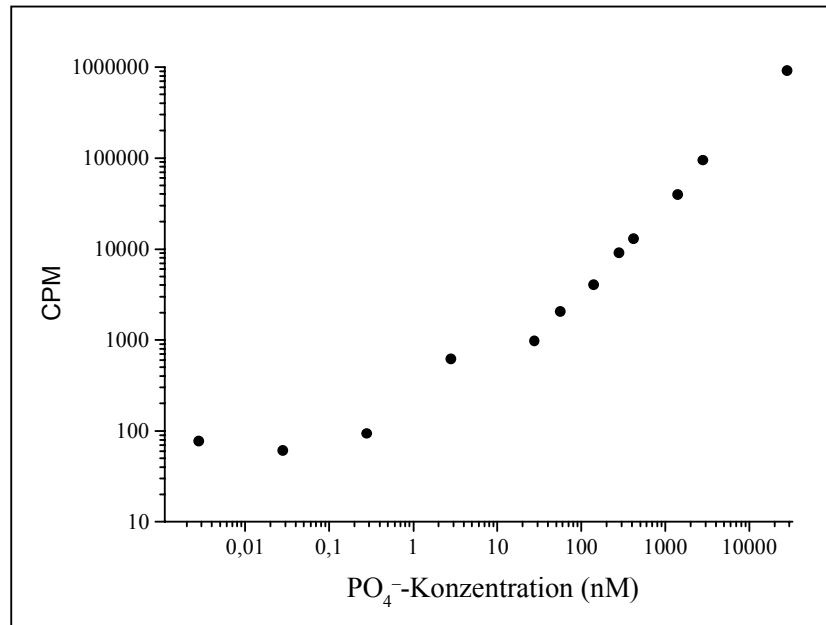


Abb. 4.18: Qualitative Abschätzung des potentiellen Meßbereichs des Szintillations-Zählers

Diese Versuchsdurchführung sollte eine qualitative Aussage zulassen, ob bei Meßwerten um die 10.000 cpm eine prinzipielle Messung der Radioaktivität möglich ist. Auf keinen Fall sollte damit eine Korrelation zwischen Counts per Minutes und eingebauter Phosphatmenge festgestellt werden.

Der Versuchsansatz wurde daraufhin modifiziert. Ziel der folgenden Modifikationen sollte ein detektierbarer Unterschied zwischen einer mit DMSO bzw. 2,3,7,8-TCDD behandelten Probe sein. In den Ergebnissen von Blankenship (1997) wurde bei einer TCDD-Konzentration von $c = 1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ eine maximale Phosphorylierungs-Aktivität gegenüber Src-Substratpeptid beobachtet.

Die nachfolgende Auflistung gibt eine Übersicht über die durchgeführten Modifikationen. Generell wurde jeweils eine Probe mit DMSO bzw. 2,3,7,8-TCDD in einer Endkonzentration von $c = 1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ behandelt (mindestens zwei unabhängige Experimente). Die Durchführung erfolgte parallel der in „Material und Methoden“ beschriebenen Vorschrift mit den jeweiligen Variationen (Kap. 3.12.2).

➤ Variation der Proteinmengen (cytosolische Fraktion)

40; 20; 10; 5; 1; 0,2 µg Homogenat

- ⊗ kein detektierbarer Unterschied zwischen DMSO und TCDD, keine Unterschiede zwischen den einzelnen Proben mit unterschiedlichen Proteinmengen

➤ Variation der Substratpeptid-Konzentration

c(Substratpeptid) = 1; 0,5; 0,25; 0,125 mM

- ⊗ kein detektierbarer Unterschied zwischen DMSO und TCDD, keine Unterschiede zwischen den einzelnen Proben mit unterschiedlichen Proteinmengen

➤ Variation der ATP-Konzentration

c(ATP) = 150; 100; 50; 10; 1 µM

- ⊗ kein detektierbarer Unterschied zwischen DMSO und TCDD, keine Unterschiede zwischen den einzelnen Proben mit unterschiedlichen Proteinmengen

➤ Variation der Inkubationszeit (nach Zugabe von Substratpeptid, normal 1 Minute)

t = 3; 6; 9; 12; 15; 20; 30 min

- ⊗ kein detektierbarer Unterschied zwischen DMSO und TCDD, ungefähr 50 %ige Erhöhung der „Counts per Minutes“ bei t > 6 Minuten

Abschließend wurde der PTK-Assay zusätzlich unter Verwendung von isoliertem c-Src-Protein (Oncogene) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog der Versuchsvorschrift (Kap. 3.12.2). Folgende Kombinationen wurden angewendet:

- ① c-Src (0,2 U) + Substratpeptid
- ② c-Src (0,2 U) + Substratpeptid + 2,3,7,8-TCDD (Endkonzentration $c = 1 \cdot 10^{-9}$ M)
- ③ c-Src (0,2 U) + Substratpeptid + cytosolisches Homogenat
- ④ c-Src (0,2 U) + Substratpeptid + cytosolisches Homogenat + 2,3,7,8-TCDD (Endkonzentration $c = 1 \cdot 10^{-9}$ M)
- ⑤ c-Src (0,2 U) + Substratpeptid + cytosolisches Homogenat + DMSO

Das Ergebnis der Messung im Szintillations-Zähler ist in Abb. 4.19 dargestellt.

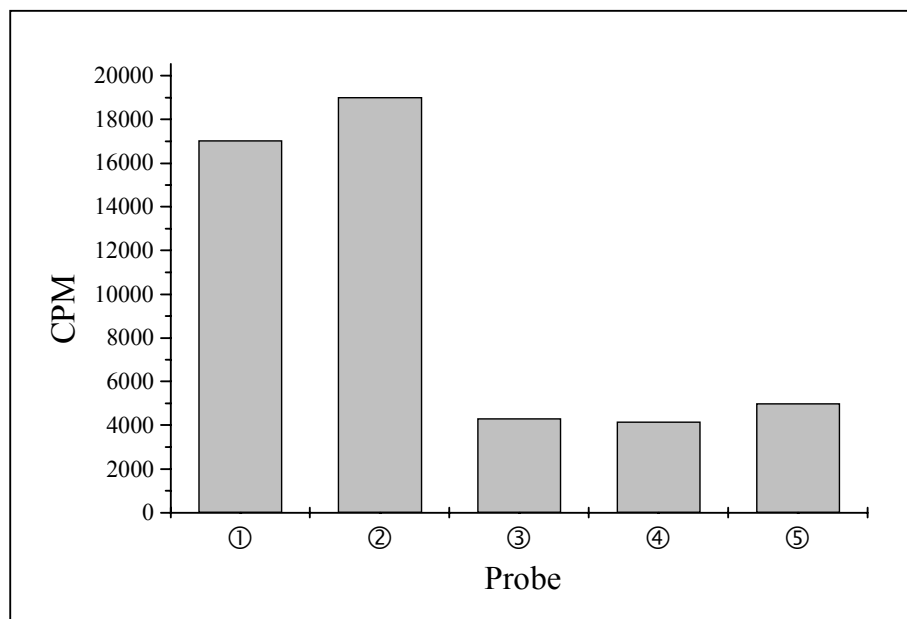


Abb. 4.19: Bestimmung der Phosphorylierung bei Verwendung von c-Src im PTK-Assay

Es war eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung des Substratpeptids bei Verwendung des cytosolischen Homogenats zu beobachten. Der gleiche Versuch wurde noch einmal unter Verwendung von frisch angesetztem Na_3VO_4 (Phosphatase-Inhibitor, verschiedene Konzentrationen) durchgeführt. Es zeigte sich praktisch das gleiche Ergebnis (nicht aufgeführt).

4.3.2 Qualitative Abschätzung der Kinase-Aktivität in primären Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von TCDD

Da die obigen Versuche keine befriedigenden Resultate bezüglich der Bestimmung der selektiven c-Src-Aktivität im Cytosol (Rattenleber) nach Blankenship (1997) ergaben, sollte zunächst eine qualitative Abschätzung der Gesamtphosphorylierung in primären Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von 2,3,7,8-TCDD durchgeführt werden.

Primäre Rattenhepatozyten wurden nach den üblichen Vorschriften in $\text{NIH}_{\text{A/B}}$ -Medium ausgesät und kultiviert. Die Behandlung erfolgte mit 2,3,7,8-TCDD in den Konzentrationen $c = 3 \cdot 10^{-13}$; $3 \cdot 10^{-11}$; $3 \cdot 10^{-10}$; $3 \cdot 10^{-9}$ M und DMSO als Kontrolle für 6 Stunden im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen aufgearbeitet und homogenisiert. Eine definierte Menge dieses Gesamthomogenats wurde in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Verteilung der Radioaktivität wurde mittels eines Röntgenfilms qualitativ erfaßt. Der Versuch wurde mehrmals wiederholt. Repräsentativ ist das Ergebnis eines solchen Versuches in Abb. 4.20 dargestellt.

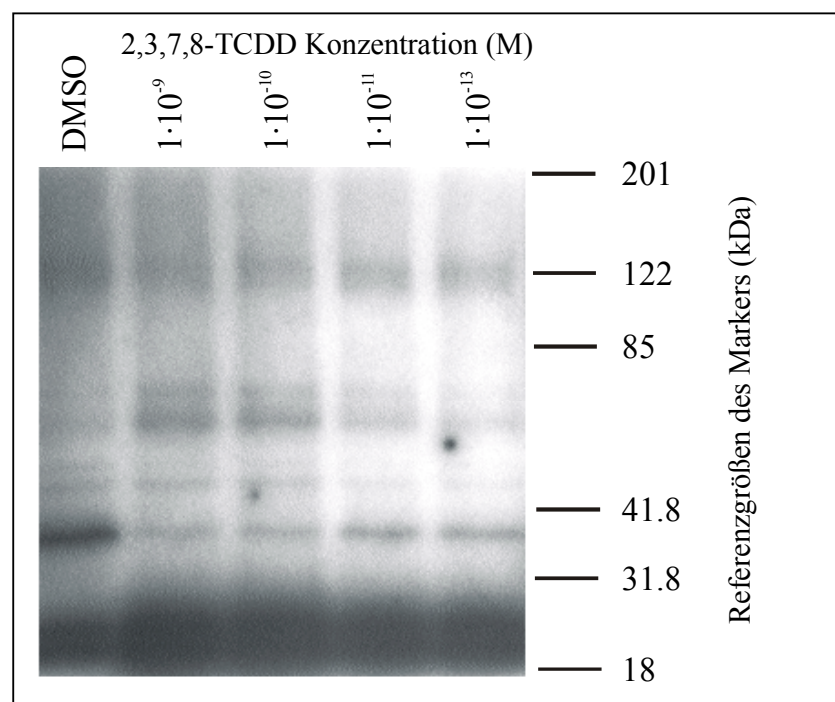


Abb. 4.20: Qualitative Abschätzung der Phosphorylierung in Abhängigkeit von TCDD

Es ist eine Doppelbande bei ~ 20 kDa zu erkennen, die mit zunehmender 2,3,7,8-TCDD Konzentration stärker wird. Parallel hierzu ist bei ~ 40 kDa eine Bande zu erkennen, die bei der DMSO-Kontrolle eine stärkere Schwärzung als bei den TCDD-Proben zeigt. Schwach läßt sich bei ~ 60 kDa eine Bande erkennen, die bei höheren TCDD-Konzentrationen an Intensität zunimmt.

5 DISKUSSION

5.1 PCB induzierte CYP1A-Isoenzym Aktivität

In der Diskussion sollen zum besseren Verständnis der Ergebnisse, die von Schmitz (1995) veröffentlichten Daten mit aufgeführt werden. In den nachfolgenden Abbildungen sind diese mit den bereits im Ergebnisteil aufgeführten Daten dargestellt.

Die anschließende Tabelle (Tab. 5.1, S. 88) listet die gefunden EC_{50} -Werte, komplementiert um die publizierten Daten auf. Abschließend sind die resultierenden „relative potencies“ und die von der WHO veröffentlichten TEF-Werte (Van den Berg, 1998) tabellarisch aufgeführt (Tab. 5.2, S. 90).

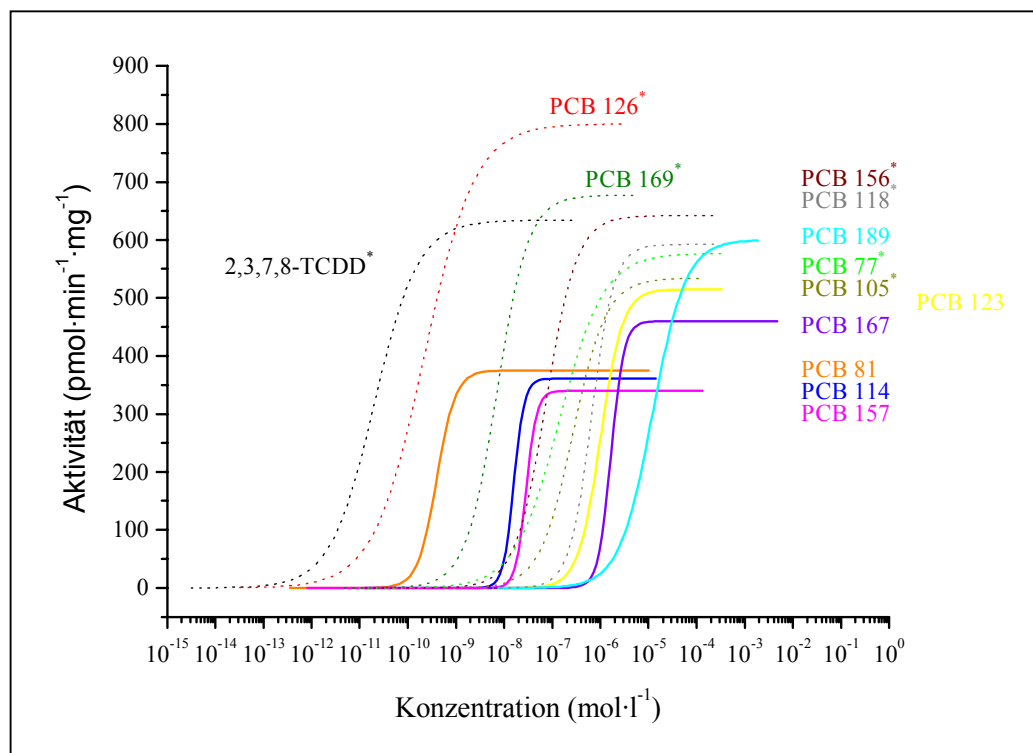


Abb. 5.1: Induktion der EROD-Aktivität in primären Rattenhepatozyten (*Schmitz, 1995)

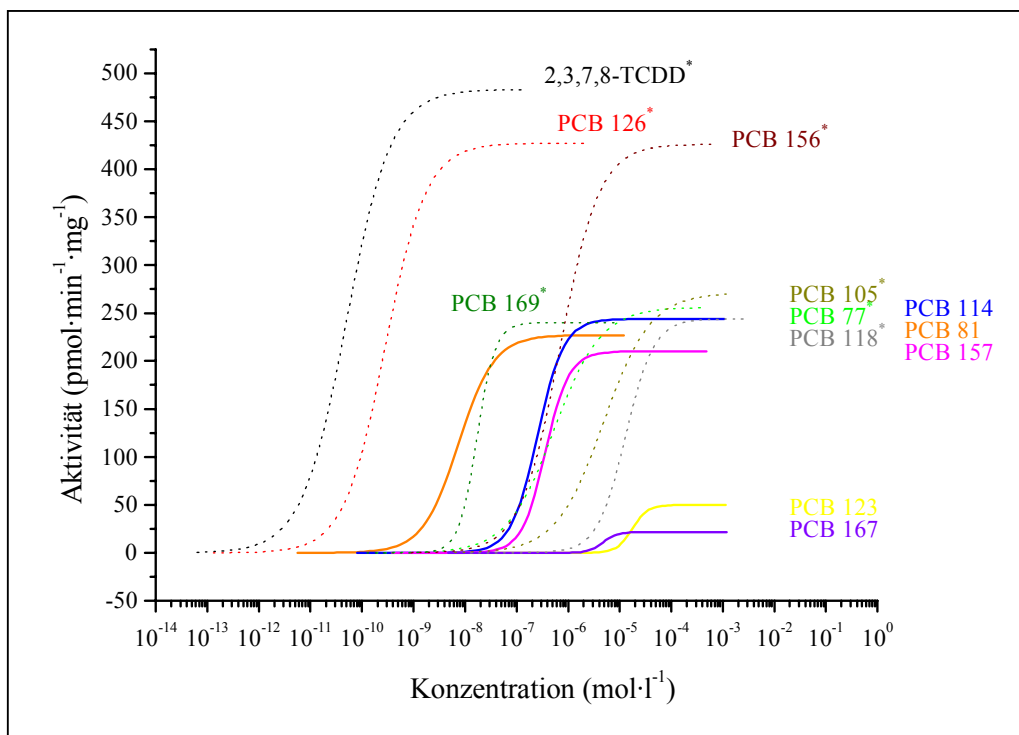


Abb. 5.2: Induktion der EROD-Aktivität in H4IIE-Zellen (*Schmitz, 1995)

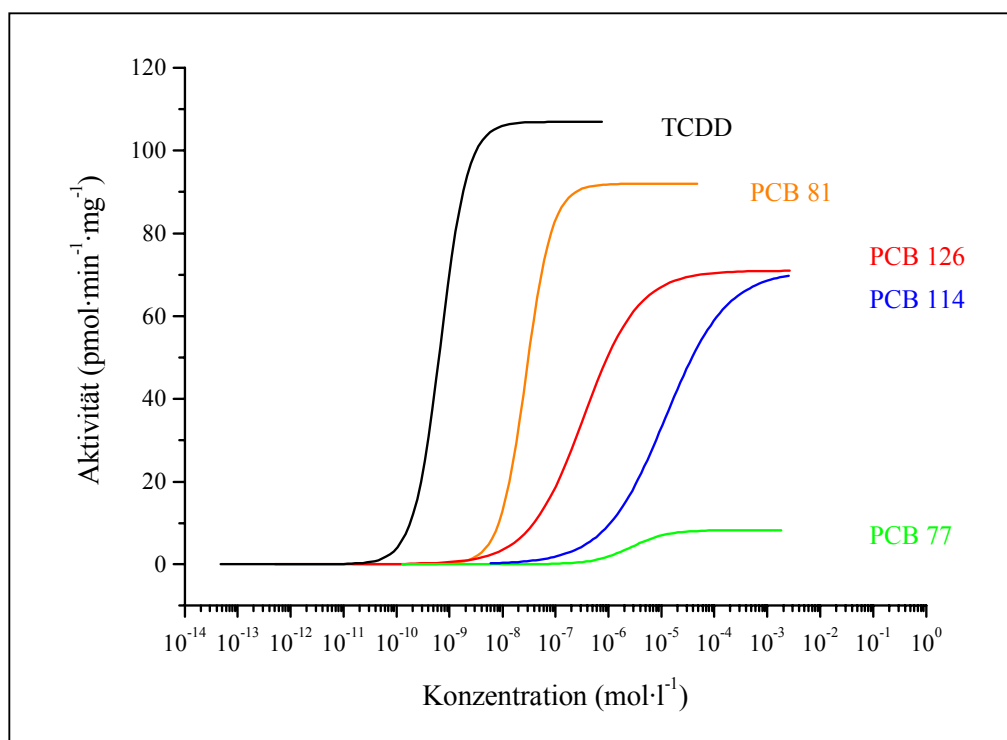


Abb. 5.3: Induktion der EROD-Aktivität in HepG2-Zellen

Die zu beobachtenden Unterschiede der maximalen EROD-Induktion innerhalb eines Zelltypus, stellen ein prinzipielles Problem bei der Bestimmung und Vergleichbarkeit der EC_{50} -Werte und den resultierenden REP-Werten dar. Dieses Phänomen wird für PCBs auch bei anderen Zellentypen beobachtet, z.B. Schweine-Hepatozyten (Van der Burght, 2000) und MCF-7 Zellen (Pang, 1999).

Der EC_{50} -Wert beschreibt die Konzentration einer Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der 50% der Wirkung vorliegen. Bei einem Vergleich dieser Größen sollten die zu messenden Effekte annähernd gleich sein bzw. der Vergleich sich auf die maximal zu beobachtende Induktionshöhe beziehen. Letzteres ist nicht möglich, da einige PCB-Kongenere unter dem Halbmaximal-Wert liegen (z.B. PCB 167 und 123 in H4IIE-Zellen). In diesem Fall wird zur Bestimmung des EC_{50} -Wertes, der Wendepunkt der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve verwendet. Untersuchungen zeigen, daß dieses Vorgehen dem TEF-Konzept nicht zuwider läuft (Schmitz, 1995; Van den Berg, 1998).

Der bei einigen PCBs zu höheren Konzentrationen auftretende Abfall der EROD-Aktivität wird bereits von Schmitz (1994) in primären Rattenhepatozyten und H4IIE Zellen für die von ihm getesteten PCBs beobachtet. Dieser Effekt wird ebenfalls von mehreren Autoren beschrieben. Als mögliche Ursache diskutieren diese eine potentielle Cytotoxizität, kompetitive Hemmung der Enzymaktivität oder Porphyrin-Akkumulation (Hahn, 1993; Pang, 1999; Tysklind, 1995; Van der Burght, 1999).

Dieses Phänomen sollte bei der Beurteilung der Effizienz (maximale Induktion) der Kongeneren nicht außer Acht gelassen werden. Zur Berechnung der Aktivität wird die Gesamtproteinmenge benutzt. Bei einer möglichen Cytotoxizität würde das Material toter Zellen mit einbezogen werden und die Aktivität dadurch gesenkt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Überlegung nicht hinreichend verfolgt werden. Für die PCBs 81, 126 und 169 wird eine Schädigung der Zellen mit Hilfe des Farbstoffes Alamar Blue für primären Rattenhepatozyten gezeigt (Kap. 3.11). Da bei der Anpassung der sigmoidalen Kurven die bei höheren Konzentrationen deutlich abfallenden Meßpunkte nicht berücksichtigt werden, soll daher von einer prinzipiellen Vergleichbarkeit der Effizienz ausgegangen werden.

Vergleicht man zunächst einmal die gefundenen EC_{50} -Werte der einzelnen Zelltypen, so zeigt sich, daß die menschliche Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 weniger empfindlich gegenüber den getesteten PCB-Kongeneren ist (Tab. 5.1). Im Rahmen der zur Verfügung stehenden Konzentrationen zeigen lediglich die PCBs 77, 81, 114 und 126 eine meßbare EROD-Aktivität. Eine Erhöhung der Konzentration für die verbleibenden PCBs war nicht sinnvoll, da unter den gegebenen Versuchsbedingungen generell ab einer Konzentration von $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M ein weißer Niederschlag zu beobachten war und die Zellen geschädigt wurden.

Tab. 5.1: Zusammenfassung der EC₅₀ -Werte für die jeweiligen PCBs

Induktor	EC ₅₀ (nM)		
	HepG2	prim. Ratten-Hepatozyten	H4IIE
TCDD	0,68	0,02	0,05*
PCB 77 ⁿ	2700	140*	530*
PCB 81 ⁿ	28	0,41	7,4
PCB 126 ⁿ	340	0,22*	0,28*
PCB 169 ⁿ	n.d.	7,1*	17*
PCB 105 ^m	n.d.	270*	4800*
PCB 114 ^m	12000	16	253
PCB 118 ^m	n.d.	660*	13000*
PCB 123 ^m	n.d.	1000	17500
PCB 156 ^m	n.d.	74*	690*
PCB 157 ^m	n.d.	29	361
PCB 167 ^m	n.d.	1670	4740
PCB 189 ^m	n.d.	12100	n.d.

*Schmitz (1995)

n.d. = nicht detektierbar

n = non-ortho

m = mono-ortho

Das non-ortho substituierte PCB 81 zeigt in HepG2-Zellen den kleinsten EC₅₀-Wert und stellt somit den potentesten Induktor unter den verwendeten PCBs dar. Dies drückt sich ebenfalls im Vergleich der „relative potencies“ aus. Für PCB 81 berechnet sich ein um den Faktor 10 höherer REP-Wert als für das PCB 126 (Tab. 5.2).

Den unerwartet hohen REP-Wert im Vergleich zum TEF konnten bereits andere Autoren bestätigen: 0,1 in HepG2-Zellen (Pang, 1999) und 0,2 in Hühnerhepatozyten (Kennedy, 1996). Da das PCB 81 eine in Umweltproben relevante Größe darstellt, sollte über eine Neueinschätzung und Beurteilung des TEF-Wertes nachgedacht werden

Für das PCB 77 ist in HepG2-Zellen eine sehr geringe Effizienz (maximale Induktion) zu beobachten. Bei der Untersuchung des mRNA-Levels mittels Northern-Blot konnte keine Erhöhung festgestellt werden. Vergleicht man die Northern-Blot Ergebnisse der PCBs 81, 114 und 126 mit der EROD-Induktion, so zeigt sich, daß eine Erhöhung des RNA-Levels unter den gegebenen Versuchsbedingungen zwar parallel aber erst bei höheren PCB-Konzentrationen als die Erhöhung der EROD-Aktivität stattfindet. Somit könnte das Fehlen der cypla-Banden für PCB 77 in der Northern-Blot Analyse auf eine geringere Empfindlichkeit in Kombination mit einer auftretenden Schädigung der Zellen bei hohen PCB-Konzentrationen zurückzuführen sein.

Tab. 5.2: Zusammenfassung der REP- und TEF-Werte für die verwendeten PCBs

Induktor	REP			TEF
	HepG2	prim. Ratten-Hepatozyten	H4IIE	WHO
TCDD	1	1	1	1
PCB 77 ⁿ	0,0003	0,0001*	0,00009*	0,0001
PCB 81 ⁿ	0,02	0,05	0,007	0,0005
PCB 126 ⁿ	0,002	0,09*	0,2*	0,1
PCB 169 ⁿ	n.d.	0,003*	0,003*	0,01
PCB 105 ^m	n.d.	0,00007*	0,00001*	0,0001
PCB 114 ^m	0,00006	0,001	0,0002	0,0005
PCB 118 ^m	n.d.	0,00003*	0,000004*	0,0001
PCB 123 ^m	n.d.	0,00002	0,000003	0,0001
PCB 156 ^m	n.d.	0,0003*	0,00007*	0,0005
PCB 157 ^m	n.d.	0,0007	0,0001	0,0005
PCB 167 ^m	n.d.	0,00001	0,00001	0,00001
PCB189 ^m	n.d.	0,000002	n.d.	0,0001

*Schmitz (1995)

n.d. = nicht detektierbar

n = non-ortho
m = mono-ortho

Als Ursache für die unterschiedliche Effizienz einzelner PCBs wird eine mögliche reduzierte Rezeptor-Aktivierung bzw. Transaktivierung durch die Kongenere diskutiert (Van der Burght, 1999)

Überraschenderweise zeigt das non-ortho substituierte PCB 169 keine EROD-Induktion, dies deckt sich mit den Beobachtungen von Pang (1999). Das PCB 169 ist in primären Rattenhepatozyten und in H4IIE-Zellen als eines der potentesten Induktoren einzuordnen (Schmitz, 1995). Als mögliche Ursache wäre eine Hemmung der CYP1A-Aktivität zu diskutieren. Pang (1999) konnte eine Inhibierung des TCDD-induzierten Östrogen-Metabolismus durch PCB 169 in MCF-7 nachweisen, der ebenfalls als ein Maß für die CYP1A Aktivität zu werten ist. Ein solcher Effekt würde in dem hier verwendeten Versuchssystem eine Ah-Rezeptor vermittelte Genexpression überdecken.

Die anschließend durchgeführte Northern-Blot Analyse zeigt eindeutig, daß das PCB 169 in HepG2-Zellen keine Erhöhung des CYP1A mRNA-Levels verursacht. Parallel hierzu zeigen die übrigen EROD-inaktiven PCBs ebenfalls keine detektierbare CYP1A mRNA-Erhöhung. Eine Hemmung der CYP1A Aktivität als Ursache für die nicht zu beobachtende EROD-Induktion ist hier ebenfalls auszuschließen.

Der markante Speziesunterschied macht deutlich, daß eine Extrapolation von Daten gewonnen aus tierischen Zellsystemen nur bedingt möglich ist und eine Ausweitung der Untersuchungen auf menschliche Zellen nötig ist.

Das PCB 114 zeigt als einziges mono-*ortho* substituiertes Kongener eine EROD-Induktion in HepG2 Zellen mit einem EC_{50} -Wert von 12 μ M. Der daraus resultierende REP-Wert von 0,0006 liegt in einer Größenordnung wie er bei Affen- und Schweinehepatozyten gefunden wird (Van der Burgt 1999 bzw. 2000).

Die mono-*ortho* substituierten PCBs 105, 118, 123, 156, 157, 167 und 189 zeigen im Gegensatz zur den primären Rattenhepatozyten und H4IIE-Zellen (Ausnahme PCB 189) keine EROD-Induktion in HepG2-Zellen. In der Northern-Blot Analyse kann ebenfalls keine Erhöhung des CYP1A-mRNA Levels detektiert werden.

Eine einzelne feste Größe als Ursache für die reduzierte EROD-Aktivität in menschlichen Zellen im Vergleich zur Ratte ist unwahrscheinlich (z.B. genetische Unterschiede in den Bindungsregionen des AhR/ARNT-Komplexes), da sich diese in gleichem Maße auf alle PCBs auswirken müßten. Vielmehr spielen hier mehrere unterschiedliche Faktoren eine Rolle, die für jedes einzelne Kongener unterschiedlichen Einfluß besitzen. Vergleicht man den EC_{50} -Wert von PCB 81 in HepG2-Zellen ($EC_{50} = 28$ nM) und primären Rattenhepatozyten ($EC_{50} = 0,41$ nM), so zeigt sich eine um zwei Größenordnungen reduzierte Potenz des Induktors. Dieses Verhältnis setzt sich bei den anderen PCBs nicht fort. Möglich wären hier unterschiedliche Aufnahme oder Metabolismus der PCBs.

PCB 123, 167 und 189 zeigen in primären Rattenhepatozyten und der Rattenhepatom-Zelllinie H4IIE die auffälligsten Effizienz-Unterschiede. Prinzipiell zeigen die H4IIE-Zellen eine um den Faktor 10 geringere Empfindlichkeit. Wie bereits geschildert, könnte eine etwaige Cytotoxizität die Höhe der Induktion reduzieren. Für das PCB 189 kann in primären Rattenhepatozyten bereits eine deutliche Abnahme der EROD-Aktivität bei hohen Konzentrationen detektiert werden. Auf H4IIE-Zellen mit einem Faktor 10 bezogen, wäre dies eine Erklärung für das Ausbleiben einer meßbaren EROD-Aktivität.

5.2 Beeinflussung der Apoptose in primären Rattenhepatozyten

Die Hemmung der Apoptose als entscheidendes Kriterium in der Tumorpromotion in der Leber wurde von mehreren Autoren hervorgehoben (Bursch, 1984; Tomei, 1988; Wright, 1994). Für 2,3,7,8-TCDD als stärkster Tumorpromotor der Leber bei Nagern, wurde der Nachweis erbracht, daß es *in vivo* die Apoptose in präneoplastischen Rattenhepatozyten unterdrückt (Stinchcombe, 1995).

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Beeinflussung der Apoptose (basal und induziert) durch die „dioxinartigen“ PCBs 81, 126 und 169 untersucht werden. Analog bereits im Arbeitskreis durchgeführter Untersuchungen (Grün, 1998; Bohnenberger, 2000), wurden die Hepatozyten zur Induktion der Apoptose mit UV-Strahlung behandelt.

5.2.1 Beeinflussung der basalen Apoptose

Für das PCB 81 und 126 (Abb. 4.6 bzw. Abb. 4.7) konnte eine Induktion der basalen Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration nachgewiesen werden. Signifikante Änderungen wurden für das PCB 81 bei einer Konzentration von $c = 1,5 \cdot 10^{-9}$ M und für das PCB 126 bei $c = 1 \cdot 10^{-8}$ M nachgewiesen. Diese Beobachtungen laufen parallel mit Untersuchungen mit 2,3,7,8-TCDD in primären Rattenhepatozyten (Sandwich-Kultur). Hierbei konnte ebenfalls eine Induktion der basalen Apoptoserate auf fluoreszenzmikroskopischem Wege detektiert werden (persönliche Mitteilung S. Kunz, AK Schrenk).

Für das PCB 126 wurde eine stetige Steigerung der Apoptoseinzidenz beobachtet. Die maximale Erhöhung gegenüber dem DMSO-Kontrollwert um ca. 39 % wurde bei einer Konzentration von $c = 1 \cdot 10^{-7}$ M beobachtet. Für das PCB 81 wurde eine maximale Steigerung der Rate um ca. 37 % bei einer Konzentration von $c = 1,5 \cdot 10^{-8}$ M detektiert. Bei einer Konzentration von $c = 3 \cdot 10^{-8}$ M fiel die Rate auf ca. 18 % gegenüber dem Kontrollwert zurück. Das PCB 169 (Abb. 4.8) zeigte in den Untersuchungen keine Beeinflussung der Apoptoserate in dem verwendeten Konzentrationsbereich.

Um eine mögliche Erklärung für den Abfall der Apoptoserate bei hohen Konzentration von PCB 81 zu bekommen, wurde mittels des Farbstoffes Alamar Blue eine Bestimmung der Cytotoxizität der drei PCBs bei den vier höchsten Konzentrationen durchgeführt (Abb. 4.13). Hierbei zeigte sich, daß alle drei PCBs bei hohen Konzentrationen zu einer verminderten Umsetzung des Farbstoffes führen. Dieses Ergebnis läßt zunächst den Schluß zu, daß eine Schädigung der Zellen durch hohe PCB-Konzentrationen verursacht wird und somit die Apoptoserate durch Überlagerung cytotoxischer Effekte bei der vorliegenden Versuchsanordnung gesenkt wird. PCB 169 zeigte bei den verwendeten Konzentrationspunkten die stärksten Veränderungen in der Vitalität und könnte somit den größten überlagernden Effekt bei der fluoreszenzdetektorischen Bestimmung der Apoptoserate verursachen.

Hingegen laufen die Ergebnisse der Cytotoxizität für PCB 81 und 126 nicht parallel zum Verlauf der Apoptoserate. PCB 81 zeigte den geringsten Einfluß auf die Vitalität, dennoch ist hier im Gegensatz zum PCB 126 eine Erniedrigung der Apoptoseinzidenz zu beobachten. Daher ist vielleicht das cytotoxische Potential der PCBs eine relevante Größe bei der

gewählten Versuchsanordnung. Das zu beobachtende Resultat für PCB 169 (keine Induktion der Apoptose) im Vergleich zu PCB 81 und 126 läßt sich daher nicht gänzlich auf diesen cytotoxischen Effekt reduzieren.

Eine parallel durchgeführte Messung an apoptoseinduzierten Rattenhepatozyten (Abb. 4.14) zeigt, daß die Zellen schon beim DMSO-Kontrollwert nicht mehr in der Lage sind, den Farbstoff in die fluoreszenzdetektierbare Form umzusetzen. Folglich spielen weitere Faktoren, die zur Umsetzung des Farbstoffes beitragen, eine Rolle und kommen bei den durch UV-Licht apoptoseinduzierten Zellen zum Tragen. Es ist daher nicht ganz auszuschließen, daß die oben beschriebenen cytotoxischen Effekte Artefakte irgendwelcher weiterer Faktoren darstellen. Der zu beobachtende Abfall der EROD-Aktivität bei hohen Konzentrationen läßt aber dennoch den Schluß zu, daß hier mögliche Schädigungen der Zellen zum Tragen kommen. Folglich ist eine Bewertung mit Hilfe des Farbstoffes Alamar Blue zwar kritisch aber für nicht UV-behandelte Zellen zulässig und stellt eine mögliche Einschätzung für die Cytotoxizität der PCBs dar.

5.2.2 Beeinflussung der induzierten Apoptose

Wurde in primären Rattenhepatozyten durch UV-Strahlung Apoptose induziert, so stieg die Apoptoserate beim Kontrollwert absolut auf 3,71 % (Mittelwert) an. Für alle drei PCBs konnte ein tendenziell ähnlicher Verlauf der Inzidenz in Abhängigkeit von der Konzentration detektiert werden. Es zeigte sich, daß die PCBs bei kleinen Konzentrationen nicht signifikant die Apoptoserate beeinflussen. Steigerte man die Konzentration im Medium weiter, so kam es zu einer deutlichen Hemmung der Apoptose. Für PCB 81 wurde bei $c = 1,5 \cdot 10^{-9}$ M eine maximale Hemmung auf ca. 61 % gegenüber dem Kontrollwert gefunden, für PCB 126 auf ca. 70 % ($c = 3 \cdot 10^{-9}$ M) und für PCB 169 auf ca. 54 % ($c = 1 \cdot 10^{-7}$ M).

Im weiteren Verlauf kam es nun zu einem sprunghaften Anstieg der Apoptose, die für das PCB 126 und 169 ungefähr auf der Höhe der DMSO-Kontrolle lag. Bei den höchsten verwendeten Konzentrationen fiel die Apoptoserate wieder signifikant ab.

Es liegt hier die Vermutung nahe, daß vereinfachend zwei Phänomene sich überlagern: zunächst ein die induzierte Apoptose hemmender Effekt, der bereits von Wörner (1996) für 2,3,7,8-TCDD und für „Phenobarbital-Typ“ PCBs (Bohnenberger, 1999) beobachtet wurde. Bei Steigerung der Konzentration kommt es zu einem zweiten Effekt, der Apoptose induziert und den hemmenden Effekt fast vollständig überlagert. Für das PCB 81 und 126 liegt die Vermutung nahe, daß es sich hier um den bereits oben beschriebenen Effekt handelt. Für das PCB 169 gilt dies nicht, da hier keine Induktion der basalen Apoptose beobachtet wurde. Vielleicht liegt hier ein von der basalen Apoptoseinduktion unabhängiger Effekt vor.

Die in allen drei Fällen bei der höchsten Konzentration auftretende Erniedrigung der Apoptoserate könnte auf einen möglichen cytotoxischen Effekt der PCBs zurückzuführen sein. Dennoch ist hier die bereits oben erwähnte Ausführung zu beachten.

5.2.3 Mechanistischer Ansatz

Eine mechanistische Erklärung zu den Beobachtungen ist nicht möglich, dennoch sollen hier einige Gesichtspunkte erwähnt werden.

Werden Zellen mit UV-Strahlung behandelt, so kommt es u.a. zu Doppelstrangbrüchen und zur Ausbildung eines Cyclobutan-Vierringes zwischen zwei benachbarten Thyminbasen. Reparatur-Mechanismen versuchen diese DNA-Schäden zu beheben, und als Folge kommt es zur Aktivierung von p53, das eine Arretierung des Zellzyklus bewirkt. Kann der Schaden nicht behoben werden, kommt es zur Initiierung der Apoptose.

Wörner (1996) zeigte, daß in apoptoseinduzierten Zellen (UV) der Anstieg von p53 durch 2,3,7,8-TCDD gehemmt wird. Außerdem konnte dargelegt werden, daß eine Hyperphosphorylierung von p53 in Abhängigkeit von 2,3,7,8-TCDD durch c-Src vermittelt auftritt (Wörner, 1998). In Meerschwein-Hepatozyten wurde eine Ah-Rezeptor vermittelte 2,3,7,8-TCDD abhängige c-Src Aktivierung nachgewiesen (Enan, 1995).

Köhle (1999) wies in WB-F344 Zellen eine von 2,3,7,8-TCDD abhängige Membran-Translokation von c-Src nach, die durch den Ah-Rezeptor vermittelt ablief. Außerdem wurde gezeigt, daß TCDD die Phosphorylierung am EGF-Rezeptor in konfluenten Zellen steigert. Der EGF-Rezeptor besitzt Einfluß auf die RAS-Proteine und könnte somit einen anti-apoptotischen Effekt über die MAP-Kinase Kaskade vermitteln (Schwarz, 2000).

In Mäusen konnte nachgewiesen werden, daß 2,3,7,8-TCDD oxidativen Streß verursacht (Shertzer, 1998). Oxidativer Streß kann, über den Ah-Rezeptor vermittelt, durch die Aktivierung der CYP1A-Isoenzyme verursacht werden. Diese können endo- und exogene Substanzen in sogenannte „reactive oxygenated metabolites“ ROM überführen, die zum oxidativen Streß beitragen. Einerseits führt das über DNA-Schaden zu einer p53 vermittelten Apoptose, andererseits können die ROMs den Ionenfluß in der Zelle beeinflussen, Veränderungen des intrazellulären pH-Werts verursachen oder direkt auf den Zellzyklus einwirken und zu einer von p53 unabhängigen Apoptose beitragen (Nebert, 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit dem CYP1A-Inhibitor 8-Methoxypsoralen keine Hemmung der durch die PCBs 81, 126 und 169 ausgelösten Apoptose detektiert werden. Dies deutet daraufhin, daß die Steigerung der basalen Apoptose für PCB 81 und 126 unabhängig von der induzierten CYP1A-Isoenzym-Expression stattfindet. Für 2,3,7,8-TCDD konnte hingegen eine Inhibierung der basal gesteigerten Apoptoserate durch

8-Methoxypsoralen nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung S. Kunz, AK Schrenk). Die Ursache für diese Unterschiede konnte im Rahmen der Arbeit nicht weiter verfolgt werden.

5.3 Bestimmung der Protein-Tyrosin-Kinase Aktivität (c-Src)

Untersuchungen von Enan (1995 und 1996) zeigten eine vom Ah-Rezeptor vermittelte Steigerung der Aktivität von c-Src in Abhängigkeit von 2,3,7,8-TCDD. Wie bereits erwähnt, wurde ebenfalls eine von c-Src vermittelte Hyperphosphorylierung von p53 durch 2,3,7,8-TCDD von Wörner (1998) nachgewiesen. Desweiteren besitzt c-Src die Fähigkeit zur Beeinflussung des Zellzyklus (Kefalas, 1995).

Aus diesem Grunde sollte eine Etablierung des von Blankenship (1997) beschriebenen Verfahrens zur Bestimmung der c-Src Aktivität in der cytosolischen Fraktion für primäre Rattenhepatozyten durchgeführt werden. Die Ausweitung des Assays zur Untersuchung verschiedener PCBs sollte somit erreicht werden.

Erste Messungen der c-Src Aktivität mit und ohne selektives Substratpeptid in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ erbrachten keine brauchbaren Ergebnisse, wobei die einzelnen Messungen (nicht aufgeführt) eine große Streubreite zeigten. Es wäre zu erwarten, daß die Untersuchungen mit Substratpeptid einen höheren CPM-Wert zeigen als ohne. Dies ist zunächst nicht der Fall, außerdem läßt sich keine generelle Tendenz in den Ergebnissen in Abhängigkeit von 2,3,7,8-TCDD feststellen.

Western-Blot Untersuchungen zeigten, daß in der cytosolischen Fraktion primärer Rattenhepatozyten c-Src Protein prinzipiell vorhanden ist. Die Zugabe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ zur cytosolischen Fraktion und anschließender Auftrennung mittels SDS-PAGE bestätigte, daß die Fraktion generell Enzymaktivität besitzt und die Proteine nicht nennenswert durch Proteasen während der Präparation abgebaut wurden. Weitere Versuche mit einer „Verdünnungsreihe“ von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ zeigen, daß mit dem Szintillationszähler im Bereich von 10000 cpm eine Messung möglich ist und es sich bei Schwankungen im Experiment nicht um „Geräterauschen“ handelt. Somit wäre analog der Versuchsbeschreibung eigentlich eine Detektion zu erwarten.

In einem weiteren Schritt wurde versucht, die Versuchsbedingungen so zu variieren, daß nach Behandlung mit 2,3,7,8-TCDD ($c = 1 \cdot 10^{-9}$ M) eine höhere Phosphorylierung des Substratpeptids gegenüber der Kontrolle (DMSO) zu beobachten war. Die Veränderung der Versuchsparameter Proteinmenge, Substratpeptid-Konzentration, ATP-Konzentration und Inkubationszeit zeigten keine Unterschiede für 2,3,7,8-TCDD gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Wurde unter gleichen Versuchsbedingungen isoliertes c-Src als Positivkontrolle zum Assay hinzugegeben, so zeigte sich, daß das reine Enzym unter den gegebenen Versuchsbedingungen in der Lage war, das Substratpeptid zu phosphorylieren. Die Zugabe von 2,3,7,8-TCDD ergab praktisch keine Veränderung. Wurde hingegen das Enzym zur Cytosolfraktion gegeben, so wurde der Einbau von radioaktiven Phosphor unterbunden. Durch die Verwendung von frisch angesetzttem Na_3VO_4 (Phosphatase-Inhibitor) in verschiedenen Konzentrationen konnte ausgeschlossen werden, daß es zu einer Dephosphorylierung des Substratpeptides während der Inkubation kam.

Eine Erklärung für die Beobachtung, daß reines Enzym im Cytosol seine Wirkung verliert, war nicht möglich. Eine Inaktivierung des Enzyms wäre prinzipiell durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen möglich oder durch Phosphorylierung des Tyrosins-Restes in der Tail-Region. Im Rahmen der Arbeit konnte dies nicht weiter verfolgt werden.

Köhle (1999) konnte eine von 2,3,7,8-TCDD abhängige Erhöhung der Src Phosphorylierungs-Aktivität in der Membranfraktion von WB-F344 Zellen beobachten. Dies deckt sich mit der Beobachtung, daß Src nur nach Membranverankerung über die SH4-Domäne aktiv vorliegt (Courtneidge, 1980). Es scheint so, daß Src in der cytosolischen Umgebung durch nicht bekannte Mechanismen inaktiviert bzw. durch Mangel einer möglichen Membranbindungsstelle nicht aktiv vorliegen kann.

Wurden primäre Rattenhepatozyten für 6 Stunden mit 2,3,7,8-TCDD inkubiert, das hieraus resultierende Gesamthomogenat in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, so zeigten sich verschiedene von 2,3,7,8-TCDD abhängige Phänomene. Es zeigte sich eine Bande bei ca. 60 kDa, deren Phosphorylierung bei zunehmender TCDD-Konzentration an Intensität zunahm. Eine anschließende Western-Blot Analyse hätte hier Aufschluß darüber gegeben, ob es sich um c-Src handelt. Dies konnte leider im zeitlichen Rahmen nicht weiter verfolgt werden. Eine weitere Doppelbande bei ca. 20 kDa zeigte ebenfalls eine mit steigender Konzentration zunehmende Phosphorylierungs-Intensität. Eine Bande bei ca. 40 kDa hingegen wies bei der DMSO-Kontrolle die stärkste Intensität auf, die mit zunehmender 2,3,7,8-TCDD Konzentration abnahm.

Es zeigte sich, daß im Gesamthomogenat verschiedene 2,3,7,8-TCDD abhängige Phosphorylierungsreaktionen stattfinden. Um welche Proteine es sich hierbei handelt konnte nicht geklärt werden. Warum die von Blankenship (1997) beschriebene Versuchsdurchführung nicht etabliert werden konnte, bleibt unklar. Eine weitere Arbeitsgruppe kam zum gleichen Schluß (persönliche Mitteilung C. Köhle).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung der Induktion der Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Aktivität durch die „dioxinartigen“ PCBs 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 und 189 in der Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 und, zur Komplementierung, in primären Rattenhepatozyten und in der Rattenhepatom-Zelllinie H4IIE wurde im ersten Teil der Arbeit durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, daß die ausgewählten PCBs in HepG2 weniger potent sind als in H4IIE-Zellen bzw. primären Rattenhepatozyten. In HepG2-Zellen konnte lediglich für die PCBs 77, 81, 114 und 126 eine Induktion der EROD-Aktivität detektiert werden. Für PCB 169, eines der potentesten Kongenere in H4IIE-Zellen und primären Rattenhepatozyten, wurde keine EROD-Induktion in HepG2-Zellen gemessen. Diese und weitere Speziesunterschiede verdeutlichen, daß eine Extrapolation der Daten aus Experimenten mit Nager Zellen zur Risikoabschätzung auf den Menschen nur bedingt möglich ist. PCB 81 zeigte in den vorliegenden Messungen einen REP-Wert von 0,02 und 0,05 in HepG2-Zellen bzw. primären Rattenhepatozyten. Dieser Wert liegt deutlich über dem TEF-Wert der WHO von 0,0005. Über eine Neubeurteilung dieses umweltrelevanten PCBs sollte nachgedacht werden. Im weiteren wäre eine Ausweitung der Untersuchungen auf primäre Humanhepatozyten von Nutzen.

Die Beeinflussung der basalen und induzierten Apoptose durch die PCBs 81, 126 und 169 wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht. Es zeigte sich, daß die PCBs 81 und 126 in primären Rattenhepatozyten die basale Apoptose induzieren können. Für das PCB 169 wurde dagegen keine Veränderung der Apoptoserate im Rahmen der verwendeten Konzentrationen festgestellt. Wurde die Apoptose durch UV-Strahlung induziert, so hemmten die PCBs konzentrationsabhängig die Apoptoserate auf durchschnittlich 62% gegenüber der Kontrolle. Bei höheren Konzentrationen wurde die Inhibierung durch einen induzierenden Effekt überlagert.

Abschließend konnte im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit ein Assay zur Bestimmung der c-Src Protein-Kinase Aktivität (Blankenship, 1997) nicht etabliert werden. Es gibt Hinweise darauf, daß der Test mit der cytosolischen Fraktion nicht durchführbar ist, da eine Membranverankerung zur Aktivierung von c-Src notwendig ist. Interessant wäre dieser Assay zur Beurteilung der Induktion der c-Src Aktivität in Abhängigkeit von „dioxinartigen“ PCBs, da es Hinweise auf Ah-Rezeptor vermittelte Effekte gibt, die von c-Src abhängig verlaufen können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ahlborg, U.G., *et al.* (1992)

Risk assessment of polychlorinated biphenyls.

Nordic Council of Minister, Copenhagen Nord **26**

Ballschmiter, K., Zell, M. (1980)

Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography.

Composition of technical Aroclor- and Clophen-PCB mixtures.

Fresenius Z. Anal. Chem. **302**, 20-31

Benedict, W.F. (1973)

Arylhydrocarbon-hydroxylase-induction in mammalian liver cell culture.

Biochem. Pharmacol. **22**, 2766-9

Blankenship, A., Matsumura, F. (1997)

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60^{src}, in murine hepatic cytosol using cell-free system.

Mol. Pharmacol. **52**, 667-75

Bohnenberger, S.M. (1999)

Einfluß von polychlorierten Biphenylen (PCB) auf die Apoptose in Rattenhepatozyten.

Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

Bradlaw, J.A., Casterline, J.L., (1979)

Induction of enzyme activity in cell culture: a rapid screen for detection of planar polychlorinated organic compounds.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **62**, 904-16

Brown, M.T., Cooper, J.A. (1996)

Regulation, substrates and functions of src.

Biochim. Biophys. Acta **1287**, 121-49

Burke, D., Mayer, R. (1974)

Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene.

Drug Metab. Disp. **2**, 583-8

Bursch, W., Lauber, B., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G., Schuppler, J., Schulte-Hermann, R. (1984)

Controlled cell death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters.

Carcinogenesis **5**, 453-8

- Chackalaparampil, I., Shalloway, D. (1988)
Altered phosphorylation and activation of pp60c-src during fibroblast mitosis.
Cell **52**, 801-10
- Chen, H.S., Perdew, G.H. (1994)
Subunit composition of the heterometric cytosolic aryl hydrocarbon receptor complex.
J. Biol. Chem. **269**, 27554-8
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem. **162**, 156-9
- Cooper, J.A. (1990)
Peptides and protein phosphorylation.
Kemp, Editor, CRC Press, Boca Raton FL
- Courtneidge, S.A., Levinson, A.D., Bishop, J.M. (1980)
The protein encoded by the transforming gene of avian sarcoma virus (pp60src) and a homologous protein in normal cells (pp60proto-src) are associated with the plasma membrane.
Proc. Natl. Acad. USA **77**, 3783-7
- Deutsche Forschungsgemeinschaft – DFG (1988)
Polychlorierte Biphenyle. Mitteilung XIII der Senatskommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln.
Verlag Chemie, Weinheim
- Eisenbrand, G., Metzler, M. (1994)
Toxikologie für Chemiker.
Suttgart, New York, *Georg Thieme Verlag*
- Enan, E., Matsumura, F. (1995)
Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD).
Biochem. Pharmacol. **49**, 249-261
- Enan, E., Matsumura, F. (1996)
Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway.
Biochem. Pharmacol. **52**, 1599-1612
- Environmental Protection Agency (2001a)
<http://www.epa.gov/toxteam/pcbid/table.htm>

- Environmental Protection Agency (2001b)
<http://www.epa.gov/toxteam/pcbid/defs.htm>
- Falbe, J., Regitz, M. (1995)
Römpf Chemie Lexikon.
Stuttgart, New York, *Georg Thieme Verlag*
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983)
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. **132**, 6-13
- Fort, P., Marty, L., Piechacyk, M., el Sabrouly, S., Dani, C., Jeanteur, P., Blanchard, J. (1985)
Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family.
Nucleic Acids Res. **13**, 1431-42
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (1998)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
Spektrum Akademisch Verlag, 7. Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Gonzalez, F.J., Mackenzie, P.I., Kimura, S., Nebert, D. W. (1984)
Isolation and characterization of full-length mouse cDNA and genomic clones of 3-methylcholanthrene-inducible cytochrome P1-450 and P3-450.
Gene **29**, 281-92
- Greim, H., Deml, E. (1996)
Toxikologie
Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, *VCH Verlagsgesellschaft mbH*
- Grün, A. (1998)
Einfluß von Phenobarbital auf den programmierten Zelltod (Apoptose) in kultivierten Primärhepatocyten der Ratte.
Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern
- Hahn, M.E., Lamb, T., Schultz, M.E., Smolowitz, R.M., Stegemann, J. (1993)
Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah-receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1).
J. Aquat. Toxicol. **26**, 185-208
- Harvey, L., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J. (1996)
Molekulare Zellbiologie.
De Gruyter Verlag, 2. Auflage, Berlin, New York

- Honkakoski, P., Negishi, M. (2000)
Regulation of cytochrome P450 (*CYP*) genes by nuclear receptors.
Biochem. J. **347**, 321-37
- Hussong, R. (1999)
Charakterisierung von Agonisten des Dioxinrezeptors aus dem Tryptophanmetabolismus der intestinalen Mikroflora.
Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern
- Kannan, N. Tanabe, S., Tatsukawa, R (1988)
Potentially hazardous residues of non-ortho chlorine substituted coplanar PCBs in human adipose tissue.
Arch. Environ. Health **43**, 11-4
- Kefalas, P., Brown, T.R.P., Brickell, P.M. (1995)
Signalling by the p60^{c-src} family of protein-tyrosine kinases.
Int. J. Biochem. Cell Biol. **27**, 551-63
- Kennedy, S.W., Lorenzen, A., Jones, S.P., Hahn, M.E., Stegeman, J.J. (1996)
Cytochrome P4501A induction in avian hepatocytes cultures: A promising approach for predicting the sensitivity of avian species to toxic effects of halogenated aromatic hydrocarbons.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **141**, 214-230
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972)
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br. J. Cancer **26**, 239-57
- Knowles, B.B., Aden, D.P. (1983)
Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor.
U.S. Patent **4393133**
- Köhle, C., Gschaidmeier, H., Lauth, D., Topell, S., Zitzer, H., Bock, K.W. (1999)
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells.
Arch. Toxicol. **73**, 152-8
- Lämmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-5
- Levinson, A.D., Oppermann, H., Levintow, L., Varmus, H.E., Bishop, J.M. (1978)
Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein.
Cell **15**, 561-72.

Lipp, H.P. (1991)

Dissertation, Universität Tübingen

Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. **193**, 265-75

Ma, Q., Whitlock, J.P. Jr (1996)

A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin.

J. Biol. Chem. **272**, 8878-84

Marquardt, H., Schäfer, S.G. (1994)

Lehrbuch der Toxikologie.

Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, *BI-Wissenschafts-Verlag*

Matsumura, F., Brewster, D.W., Madhukar, B.V., Bombick, D.W. (1984)

Alteration of rat hepatic plasma membrane functions by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD).

Arch. Environ. Contam. Toxicol. **13**, 509-15

Morgan, D.O., Kaplan, J.M., Bishop, J.M., Varmus, H.E. (1989)

Mitosis-specific phosphorylation of p60c-src by p34cdc2-associated protein kinase.

Cell **57**, 775-86

Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Soli, W.A., Yang, Y., Dalton, T.P. (2000)

Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis.

Biochem. Pharmacol. **59**, 65-85

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pogna, F. (2000)

Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.

FEBS **267**, 5421-6

Pang, S., Cao, J.K., Katz, B.H., Hayes, C.L., Sutter, T.R., Spink, D.C. (1999)

Inductive and inhibitory effects of non-*ortho*-substituted polychlorinated biphenyls on estrogen metabolism and human cytochromes P450 1A1 and 1B1.

Biochem. Pharmacol. **58**, 29-38

Patandin, S., Koopman-Esseboom, C., De Ridder, M.A., Weisglas-Kuperus, N., Sauer, P.J. (1998)

Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and

growth in Dutch children.

Pediatr. Res. **44**, 538-45

Payne, C.M., Bernstein, C., Bernstein, H. (1995)

Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress DNA damage and signal-transduction pathways.

Leukemia and Lymphoma **19**, 43-93

Pitot, H.C. (1964)

Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver in vivo.

Natl. Cancer Inst. Monogr. **13**, 229-42

Pohl, R., Fouts, J. (1980)

A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions.

Anal. Biochem. **107**, 150-5

Reuber, M.D. (1961)

A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat.

J. Natl. Cancer Inst. **26**, 891-7

Rowlands, J.C., Gustafsson, J.Å. (1997)

Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction.

Crit. Rev. Tox. **27**, 109-34

Safe, S. (1990)

Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzodioxins (PCDDs), dibenzofuranes (PCDFs) and related compounds. Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs).

CRC Crit. Rev. Toxicol. **21**, 51-88

Sawyer, T., Safe, S., (1982)

PCB isomers and congeners: Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and ethoxyresorufin-O-deethylase enzyme activities in rat hepatoma cells.

Toxicol. Lett. **13**, 87-94

Schmitz, H.J. (1994)

Enzyminduzierende Wirkung umweltrelevanter Gemische polychlorierter Biphenyle (PCB) in Zellkultur der Ratte.

Diplomarbeit, Universität Tübingen

Schmitz, H.J., Hagenmaier, A., Hagenmaier, H.P., Bock, K.W., Schrenk, D. (1995)

Potency of mixtures of polychlorinated biphenyls as inducers of dioxin receptor-regulated CYP1A activity in rat hepatocytes and H4IIE cells.

Toxicology **99**, 47-54

- Schrenk, D. (1994)
Polychlorierte Biphenyle, Handbuch der praktischen Umweltmedizin.
Eis, D. (Hrsg.), Heidelberg, *Springer Verlag*
- Schrenk, D. (1998)
Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics.
Biochem. Pharmacol. **55**, 1155-62
- Schulte-Herman, R., Schuppler, J., Ohde, G., Timmermann-Trosiener, I. (1982)
Effect of tumor promoters on proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver.
Carcinog. Compr. Surv. **7**, 99-105
- Schulte-Herman, R., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G., Bursch, W. (1990)
DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion.
Cancer Res. **50**, 5227-35
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grassl-Kraupp, B., Oberhammer, F., Wagner, A. (1992)
Programmed cell death and its protective role with particular reference to apoptosis.
Toxicol. Lett. **64-65**, 569-74
- Schwarz, M., Buchmann, A., Stinchcombe, S., Kalkuhl, A., Bock, K.W. (2000)
Ah receptor ligands and tumor promotion: survival of neoplastic cells.
Toxicol. Lett. **112-113**, 69-77
- Shertzer, H.G., Nebert D.W., Puga, A., Ary, M., Sonntag, D., Dixon, K., Robinson, L.J., Cianiolo, E., Dalton, T.P. (1998)
Dioxin causes a sustained oxidative stress response in the mouse.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **253**, 44-8
- Smart, J.E., Oppermann, H., Czernilosfky, A.P., Purchio, A.F., Erikson, R.L., Bishop, J.M. (1981)
Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 6013-7
- Spencer, D.M., Graef, I., Austin, D.J., Schreiber, S.L., Crabtree, G.R. (1995)
A general strategy for producing conditional alleles of Src-like tyrosine kinases.
Proc. Natl. Acad. USA **92**, 9805-9809
- Stinchcombe, S., Buchmann, A., Bokc, K.W., Schwarz, M. (1995)
Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver.
Carcinogenesis **16**, 1271-5

Tillitt, D.E., Giesy, P.G. (1991)

Characterization of the H4IIE rat hepatoma cell bioassay as a tool for assessing toxic potency of planar halogenated hydrocarbons in environmental samples.

Environ. Sci. Technol. **25**, 87-92

Tomei, L., Kanter, P., Wenner, Ch. (1988)

Inhibition of radiation-induced apoptosis in vitro by tumor promoters.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **155**, 324-31

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350-4

Tysklind, M., Bosveld, A.T.C., Andersson, P.L., Verhallen, E., Sinnige, T., Seinen, W., Rappe, C., Van den Berg, M. (1995)

Inhibition of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and polychlorinated biphenyls.

Environ. Sci. Pollut. Res. **2**, 211-216

Universität Bochum (2001)

Abteilung Anatomie und Embryologie, Forschungsgebiet Apoptose

http://www.ruhr-uni-bochum.de/anat1/Forschungsschwerpunkte/Forschung_Apoptose.htm

Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T. (1998)

Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife.

Environ. Health Perspect. **106**, 775-92

Van der Burght, A.S.A.M., Clijsters, P.J., Horbach, G.J., Andersson, P.L., Tysklind, M., Van den Berg, M. (1999)

Structure dependent induction of CYP1A by polychlorinated biphenyls in hepatocytes of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*).

Toxicol. Appl. Pharmacol. **155**, 13-23

Van der Burght, A.S.A.M., Tysklind, M., Andersson, P.L., Horbach, G.J., Van den Berg, M. (2000)

Structure dependent induction of CYP1A by polychlorinated biphenyls in hepatocytes of male castrated pigs.

Chemosphere **41**, 1697-1708

- Whitlock, J.P. Jr (1999)
Induction of cytochrome P450 1A1.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **39**, 103-25
- Witt, J.J., Roskoski, Jr., R. (1975)
Rapid protein kinase assay using phosphocellulose-paper absorption
Anal. Biochem. **66**, 253-8
- World Health Organization – WHO (1993)
Polychlorinated biphenyls and terphenyls (2nd Edition).
Environmental Health Criteria 140. WHO, Genf
- Wörner, W., Schrenk, D. (1996)
Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor β 1.
Cancer Res. **56**, 1272-8
- Wörner, W., Schrenk, D. (1998)
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin suppresses apoptosis and leads to hyperphosphorylation of p53 in rat hepatocytes.
Environm. Toxicol. Pharmacol. **6**, 239-47
- Wright, S., Zhong, J., Larrick, J. (1994)
Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion.
FASEB J. **8**, 954-60
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R. (1980)
Cell death: the significance of apoptosis.
Int. Rev. Cytol. **68**, 251-306
- Xu, W., Harrison, S.C., Eck, M.J. (1997)
Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src.
Nature **385**, 595-601
- Yakushiji, T., Watanabe, I., Kuwabara, K., Tanaka, R., Kashimoto, T., Kunita, N., Hara, I. (1984)
Rate of decrease and half-life of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the blood of mothers and their children occupationally exposed to PCBs.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. **13**, 341-5

8 ANHANG

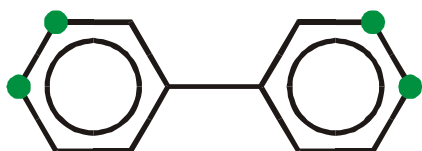
8.1 IUPAC-Nomenklatur der PCBs

Tab. 8.1: IUPAC-Nomenklatur der PCBs (Environmental Protection Agency, 2001a)

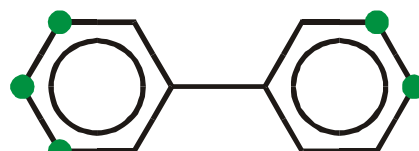
Nummer	Struktur	Nummer	Struktur	Nummer	Struktur
1	2	71	2,3',4',6	141	2,2',3,4,5,5'
2	3	72	2,3',5,5'	142	2,2',3,4,5,6
3	4	73	2,3',5',6	143	2,2',3,4,5,6'
4	2,2'	74	2,4,4',5	144	2,2',3,4,5',6
5	2,3	75	2,4,4',6	145	2,2',3,4,6,6'
6	2,3'	76	2,3',4',5'	146	2,2',3,4',5,5'
7	2,4	77	3,3',4,4'	147	2,2',3,4',5,6
8	2,4'	78	3,3',4,5	148	2,2',3,4',5,6'
9	2,5	79	3,3',4,5'	149	2,2',3,4',5',6
10	2,6	80	3,3',5,5'	150	2,2',3,4',6,6'
11	3,3'	81	3,4,4',5	151	2,2',3,5,5',6
12	3,4	82	2,2',3,3',4	152	2,2',3,5,6,6'
13	3,4'	83	2,2',3,3',5	153	2,2',4,4',5,5'
14	3,5	84	2,2',3,3',6	154	2,2',4,4',5,6'
15	4,4'	85	2,2',3,4,4'	155	2,2',4,4',6,6'
16	2,2',3	86	2,2',3,4,5	156	2,3,3',4,4',5
17	2,2',4	87	2,2',3,4,5'	157	2,3,3',4,4',5'
18	2,2',5	88	2,2',3,4,6	158	2,3,3',4,4',6
19	2,2',6	89	2,2',3,4,6'	159	2,3,3',4,5,5'
20	2,3,3'	90	2,2',3,4',5	160	2,3,3',4,5,6
21	2,3,4	91	2,2',3,4',6	161	2,3,3',4,5',6
22	2,3,4'	92	2,2',3,5,5'	162	2,3,3',4',5,5'
23	2,3,5	93	2,2',3,5,6	163	2,3,3',4',5,6
24	2,3,6	94	2,2',3,5,6'	164	2,3,3',4',5',6
25	2,3',4	95	2,2',3,5',6	165	2,3,3',5,5',6
26	2,3',5	96	2,2',3,6,6'	166	2,3,4,4',5,6
27	2,3',6	97	2,2',3,4',5'	167	2,3',4,4',5,5'
28	2,4,4'	98	2,2',3,4',6'	168	2,3',4,4',5',6
29	2,4,5	99	2,2',4,4',5	169	3,3',4,4',5,5'
30	2,4,6	100	2,2',4,4',6	170	2,2',3,3',4,4',5
31	2,4',5	101	2,2',4,5,5'	171	2,2',3,3',4,4',6
32	2,4',6	102	2,2',4,5,6'	172	2,2',3,3',4,5,5'
33	2,3',4'	103	2,2',4,5',6	173	2,2',3,3',4,5,6
34	2,3',5'	104	2,2',4,6,6'	174	2,2',3,3',4,5,6'
35	3,3',4	105	2,3,3',4,4'	175	2,2',3,3',4,5,6
36	3,3',5	106	2,3,3',4,5	176	2,2',3,3',4,6,6'
37	3,4,4'	107	2,3,3',4',5	177	2,2',3,3',4,5,6'
38	3,4,5	108	2,3,3',4,5'	178	2,2',3,3',5,5,6
39	3,4',5	109	2,3,3',4,6	179	2,2',3,3',5,6,6'
40	2,2',3,3'	110	2,3,3',4',6	180	2,2',3,4,4',5,5'
41	2,2',3,4	111	2,3,3',5,5'	181	2,2',3,4,4',5,6
42	2,2',3,4'	112	2,3,3',5,6	182	2,2',3,4,4',5,6'
43	2,2',3,5	113	2,3,3',5',6	183	2,2',3,4,4',5',6
44	2,2',3,5'	114	2,3,4,4',5	184	2,2',3,4,4',6,6'
45	2,2',3,6	115	2,3,4,4',6	185	2,2',3,4,5,5',6
46	2,2',3,6'	116	2,3,4,5,6	186	2,2',3,4,5,6,6'
47	2,2',4,4'	117	2,3,4',5,6	187	2,2',3,4',5,5',6
48	2,2',4,5	118	2,3',4,4',5	188	2,2',3,4',5,6,6'
49	2,2',4,5'	119	2,3',4,4',6	189	2,3,3',4,4',5,5'
50	2,2',4,6	120	2,3',4,5,5'	190	2,3,3',4,4',5,6

Nummer	Struktur	Nummer	Struktur	Nummer	Struktur
51	2,2',4,6'	121	2,3',4,5',6	191	2,3,3',4,4',5',6
52	2,2',5,5'	122	2,3,3',4',5'	192	2,3,3',4,5,5',6
53	2,2',5,6'	123	2,3',4,4',5'	193	2,3,3',4',5,5',6
54	2,2',6,6'	124	2,3',4',5,5'	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
55	2,3,3',4	125	2,3',4',5',6	195	2,2',3,3',4,4',5,6
56	2,3,3',4'	126	3,3',4,4',5	196	2,2',3,3',4,4',5,6'
57	2,3,3',5	127	3,3',4,5,5'	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
58	2,3,3',5'	128	2,2',3,3',4,4'	198	2,2',3,3',4,5,5',6
59	2,3,3',6	129	2,2',3,3',4,5	199	2,2',3,3',4,5,5',6'
60	2,3,4,4'	130	2,2',3,3',4,5'	200	2,2',3,3',4,5,6,6'
61	2,3,4,5	131	2,2',3,3',4,6	201	2,2',3,3',4,5',6,6'
62	2,3,4,6	132	2,2',3,3',4,6'	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
63	2,3,4',5	133	2,2',3,3',5,5'	203	2,2',3,4,4',5,5',6
64	2,3,4',6	134	2,2',3,3',5,6	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
65	2,3,5,6	135	2,2',3,3',5,6'	205	2,3,3',4,4',5,5',6
66	2,3',4,4'	136	2,2',3,3',6,6'	206	2,2',3,3',4,4',5,5',
67	2,3',4,5	137	2,2',3,4,4',5	207	2,2',3,3',4,4',5,6,
68	2,3',4,5'	138	2,2',3,4,4',5'	208	2,2',3,3',4,5,5',6,
69	2,3',4,6	139	2,2',3,4,4',6	209	2,2',3,3',4,4',5,5',
70	2,3',4',5	140	2,2',3,4,4',6'		

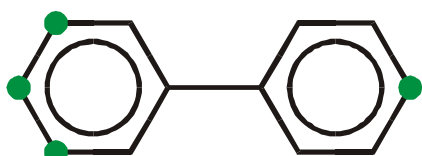
8.2 Schematische Darstellung der verwendeten PCBs



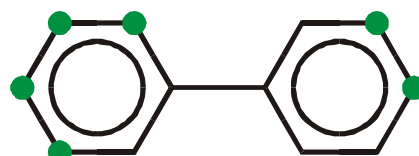
PCB 77



PCB 126



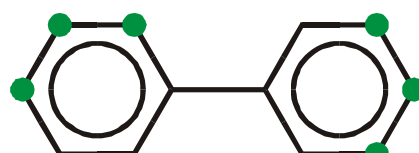
PCB 81



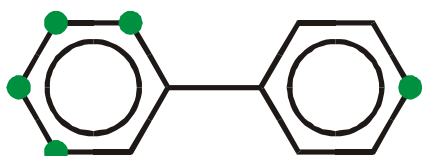
PCB 156



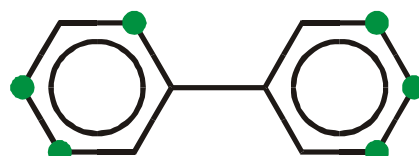
PCB 105



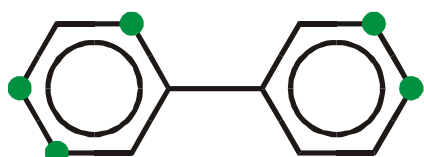
PCB 157



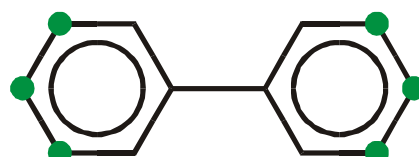
PCB 114



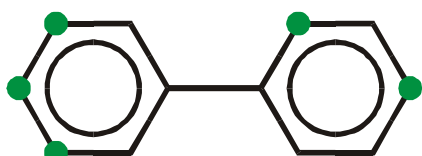
PCB 167



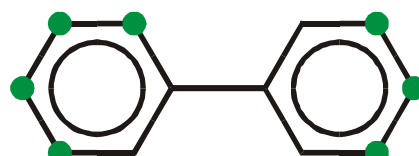
PCB 118



PCB 169



PCB 123



PCB 189

● Chlorierungsposition

Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Im besonderen bei:

Herrn Dr. H. J. Schmitz für seine selbstlose Unterstützung und Hilfe während meiner Promotionszeit und beim Erstellen dieser Arbeit.

Frau R. Hussong für das rasche Korrekturlesen und die lustige Arbeitsatmosphäre.

Frau N. Daum für die Zeit zwischen Napster und Tapas.

Herrn U. Fischbeck für die Beantwortung zahlreicher formeller Fragestellungen.

Herrn S. Konietzny für die Beantwortung zahlreicher informeller Fragestellungen.

Herrn A. Hausherr für zahlreiche Blasen, schmerzende Gelenke und unvergeßliche Momente in Elmstein.

Herrn M. Müller und Frau S. Zeiger für das was kommen wird.

Homer J. Simpson für die Vorbereitung auf das spätere Leben.

Dem Arbeitskreis für die erheiternden Augenblicke im Labor.

Lebenslauf

Name: Michael Zeiger

Geboren am: 7. August 1972

Geburtsort: Neustadt/W.

Nationalität: deutsch

Schulbildung: 1979-1983 Grundschohle Geinsheim

1983-1992 Leibniz-Gymnasium Neustadt/W.

Juni 1992 allgemeine Hochschulreife

Studium: 1992 Aufnahme des Chemiestudiums an der Universität
Kaiserslautern

November 1994 Diplomvorprüfung

Februar 1998 Diplomhauptprüfung

Anfertigung der Diplomarbeit im Arbeitskreis von
Prof. W. Trommer unter Leitung von Herrn Dr. J.
Wise

April 1998 Beginn der Doktorarbeit im Arbeitskreis von Herrn
Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

